



Impact de CD38 dans la leucémie à tricholeucocytes

Nicolas Poret

► To cite this version:

Nicolas Poret. Impact de CD38 dans la leucémie à tricholeucocytes. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S025 . tel-01279865

HAL Id: tel-01279865

<https://theses.hal.science/tel-01279865>

Submitted on 27 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole Doctorale Biologie-Santé

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences de l'Université de Lille

par

Nicolas PORET

Impact de CD38 dans la leucémie à tricholeucocytes

Soutenance le 30 Septembre 2015

Devant le jury composé de :

Professeur	Xavier TROUSSARD	Président
Docteur	Nadine VARIN-BLANK	Rapporteur
Professeur	Eric WATTEL	Rapporteur
Docteur	Catherine ROCHE-LESTIENNE	Examinatrice
Professeur	Olivier TOURNILHAC	Examineur
Docteur	Carl Simon SHELLEY	Examineur
Docteur	Sylvie GALIEGUE-ZOUITINA	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier très chaleureusement le **Docteur Sylvie Galiègue-Zouitina** pour la formation qu'elle a su me prodiguer et le travail réalisé ensemble sur ce sujet passionnant durant plus de 5 ans. Plus qu'un étudiant, vous m'avez considéré en vrai collaborateur. Merci beaucoup de m'avoir inculqué la rigueur scientifique, pour vos conseils avisés, pour votre gentillesse, votre écoute, votre patience et votre entière disponibilité, la confiance que vous avez toujours gardée en moi et votre soutien indéfectible dans les moments les plus difficiles.

J'aimerais également remercier le **Docteur Carl Simon Shelley**, pour notre collaboration enrichissante depuis le début du projet et son soutien aussi bien théorique et technique que logistique. Merci également pour sa grande contribution à l'écriture et à la réussite de notre article scientifique. *I would like to express my deep gratitude to you for all your support through all these years. Thank you for your wise advice and your unbreakable faith in our project. Our team was the best example of what an international collaboration should be. I wish you will have many other successful projects in the future.*

Je tiens également à remercier le **Professeur Xavier Troussard** pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, pour sa collaboration au projet, sa contribution à la réussite de notre article et son suivi tout au long de ma thèse.

Je remercie le **Docteur Nadine Varin-Blank** et le **Professeur Eric Wattel** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir bien voulu juger ce travail.

Je remercie également le **Professeur Olivier Tournilhac** d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse

Un grand merci également au **Docteur Soizic Guihard**, pour m'avoir formé et aidé lors de l'expérimentation animale nécessaire à ce projet. Nous n'aurions pas pu aboutir à un article de cette qualité sans ton soutien. Merci aussi pour la relecture de ce manuscrit et nos discussions. Je te souhaite beaucoup de bonheur auprès de ta famille et beaucoup de réussite dans ton avenir professionnel de chercheur, tu as du talent, tu le mérites amplement.

Je remercie le **Docteur Qiangwei Fu** pour la réalisation des expériences d'*in vivo imaging* nécessaires à notre publication, le **Docteur Edouard Cornet** pour les analyses statistiques des données de patients et le **Docteur Meyling Cheok** pour avoir fourni les souris nécessaires à nos expériences.

Je remercie également le **Docteur Catherine Roche-Lestienne** pour sa participation à mon jury de thèse et la caractérisation de nos lignées cellulaires HCL par caryotype, ainsi que **Staëlle Corvo-Chamaillard** pour la caractérisation de la lignée cellulaire HC-1.

Je tiens à remercier le **Docteur Martine Duterque** pour son implication dans mon comité de suivi de thèse.

Je remercie le **Gundersen Lutheran Medical Foundation** et l'**IRCL** pour leurs aides de financement, ainsi que le personnel de l'**IRCL** (**Matthias Gérard, Michel Marissal, Micheline Magdelon** et **Corinne Merckx**) pour leur disponibilité.

Merci à **Elisabeth** « Chérie » **Bertrand** pour nos discussions scientifiques, l'animation que tu as apportée à notre bureau, nos parties de rigolades et tes relectures de ce manuscrit.

Merci à tous les autres membres de l'équipe 3 du Centre Jean Pierre Aubert, anciens et nouveaux, et plus particulièrement à **Pauline Peyrouze, Hassiba El Bouazzati, Julie Berthe, Mélanie Lambert, Dominique Héтуin, Sabine Depauw, Anne-Lucie Nugues, Zaccharie Ségaoula, le Docteur Thierry Idziorek**, pour nos discussions, votre bonne humeur et votre soutien, au **Docteur Laure Delestré** pour m'avoir mis le pied à l'étrier à la paillasse et pour son exemple de détermination, à **Louise-Eva Vandenberght** dont l'encadrement m'a donné le goût d'enseigner.

Je remercie **Nathalie Jouy** du Service Commun de Cytométrie (ex-IMPRT) pour m'avoir formé à la cytométrie en flux et aidé lors des analyses, le **Docteur Martin Figeac** de la plate-forme de génomique du centre Jean-Pierre Aubert pour l'analyse des données du transcriptome ainsi que le **Docteur Frédéric Leprêtre** pour son aide lors du design d'amorces.

Un grand merci à mon ami le futur docteur **Matthieu** « MC » **Corvaisier**, pour son soutien, nos discussions scientifiques et ses traits d'esprit souvent suivis d'un bon fou rire. Tu es promis à un bel avenir dans la recherche. Merci également **Charles** « Carotte » **Herbaux** et **Romain** « Rouquin » **Vasseur** pour les bons moments passés au labo.

Merci à Vince Gilligan et AMC pour la série « Breaking Bad », me prodiguant des moments de divertissement durant les pauses du midi, salutaires durant la rédaction de cette thèse (parce qu'il faut bien se détendre parfois !)

Merci à **tous mes amis**, lillois principalement, pour leur soutien et nos discussions lorsqu'il fallait décompresser et relativiser.

Maman, Papa, merci infiniment pour votre aide à tous les niveaux imaginables, votre indéfectible confiance en moi, votre présence dans les meilleurs comme les pires moments, la fierté

que je vois dans vos yeux dans mes réussites et qui m'aide à avancer, pour tout l'amour dont vous m'entourez. Je ne serais pas allé bien loin sans vous.

Et tendrement, **Juliette**, merci pour tout le bonheur de notre vie commune, ton soutien au quotidien, ton aide et ta présence bienveillante, ta patience jusqu'à la fin de cette thèse et ton amour qui me donne la force de surmonter toutes les épreuves.

RESUME

La leucémie à tricholeucocytes (ou HCL pour *Hairy Cell Leukemia*) est un syndrome lymphoprolifératif B rare du sujet âgé, caractérisé par une infiltration médullaire et splénique de cellules présentant des protrusions cytoplasmiques. Des thérapies de première ligne efficaces existent contre ce cancer et l'intérêt de la recherche biomédicale dans ce domaine réside désormais dans le développement de nouvelles molécules actives contre les cellules leucémiques réfractaires aux traitements de référence. Parmi les voies de signalisation dérégulées dans l'HCL, celle des Rho-GTPases influe sur les phénomènes de croissance cellulaire et d'organisation du cytosquelette d'actine, perturbés dans les tricholeucocytes. Les travaux précédemment menés au laboratoire ont montré la sous-expression dans l'HCL d'une Rho-GTPase atypique, RhoH, dont l'expression ectopique dans un modèle cellulaire d'HCL atténue la progression tumorale. Afin de déterminer les cibles moléculaires de RhoH dans cette leucémie, une étude transcriptomique a été réalisée et a montré la sous-expression du marqueur de surface CD38 lorsque RhoH est surexprimée.

Plus qu'un marqueur de différenciation lymphocytaire, CD38 est une molécule à effets pléiotropiques (à la fois récepteur, enzyme et protéine d'adhérence cellulaire), importante dans le développement des lymphocytes B. CD38 a également été décrit comme un marqueur délétère dans la leucémie lymphoïde chronique et représente une cible thérapeutique dans le myélome multiple. Bien qu'exprimé par un tiers des patients porteurs de l'HCL, son rôle dans cette leucémie restait jusqu'alors inconnu.

Les travaux présentés dans cette thèse décrivent, d'une part, l'étude de la régulation du gène *CD38* par RhoH dans l'HCL, et d'autre part, l'impact de la protéine CD38 dans la progression de cette leucémie. Des données préliminaires sur l'activité de fragments de promoteur du gène *CD38* semblent indiquer un rôle du facteur de transcription Smad1 dans la régulation de ce gène par RhoH. Grâce à une technique de *genome editing*, nous avons produit deux lignées cellulaires HCL *knock out* pour le gène *CD38*. Ces modèles nous ont permis de déterminer que CD38 promeut la survie ainsi que l'adhésion à l'endothélium des cellules HCL, et modifie également leurs propriétés migratoires *in vitro*. Nous avons également observé que CD38 favorisait la progression tumorale dans un modèle murin de xénogreffe de ces lignées cellulaires. Enfin, des données produites par nos collaborateurs ont montré que CD38 est un marqueur de mauvais pronostic pour la rechute des patients atteints d'HCL et qu'il constitue une cible thérapeutique potentielle pour les 30% de patients qui l'expriment.

Mimer l'effet de RhoH dans l'HCL à des fins thérapeutiques s'avèrerait délicat. Le ciblage de CD38 semble donc une alternative de choix. En effet, la sous-expression de RhoH dans l'HCL favorise l'expression de cette protéine, dont l'effet est délétère pour les patients puisqu'elle participe à la progression de la leucémie. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques dirigés contre CD38 étant déjà utilisés en clinique pour traiter d'autres leucémies, ce travail ouvre la voie à l'extension de leur utilisation dans le traitement de l'HCL réfractaire, pour les patients qui l'expriment.

ABSTRACT

Hairy Cell Leukemia (HCL) is a B-lymphoproliferative disorder of the elderly, which is characterized by medullar and splenic homing of “hairy” cells bearing cytoplasmic protrusions. Efficient first-line therapies against this cancer do exist and the real challenge in biomedical research is now to develop new molecules targeting leukemic cells which are resistant to these first-line treatments. Among some deregulated signaling pathways that have been described in HCL, Rho-GTPases are noteworthy, mediating proliferation and reorganization of actin cytoskeleton, being both disrupted in hairy cells. Former works from our laboratory have shown the underexpression in HCL cells of an atypical Rho-GTPase called RhoH, which reconstitution decreased malignant progression in both *in vitro* and *in vivo* models of HCL. In order to determine the molecular targets of RhoH, a microarray study was performed that showed underexpression of the cell surface marker CD38 while RhoH is overexpressed.

Not only a differentiation marker of lymphocytes, CD38 is a pleiotropic molecule (being at the same time a receptor, an enzyme and an adhesion protein), which is important in B-cell development. It is also known as a bad prognosis marker in chronic lymphocytic leukemia and a therapeutic target in multiple myeloma. Its role in Hairy Cell Leukemia has not been studied yet, despite its expression in one third of HCL patients.

The work presented in this thesis deals with, on the one hand, the study of the regulation of *CD38* gene by RhoH in HCL, on the other hand, the impact of CD38 protein on HCL progression. Preliminary data seem to indicate a potential role of Smad1 transcription factor in this mechanism of regulation of *CD38* by RhoH. Thanks to genome editing technology, we produced two HCL cell lines knock out for the *CD38* gene. These models allowed us to prove that CD38 enhances hairy cells survival and adhesion to endothelium, and modulates their migratory features *in vitro*. We also showed that CD38 promotes disease progression *in vivo* in an HCL xenograft mouse model. Finally, data from our collaborators indicated that CD38 is a bad prognosis marker for HCL relapses and could be a potential therapeutic target.

Mimicking RhoH effects for therapeutic purposes would be somewhat tricky. Targeting CD38 seems an interesting alternative, as RhoH underexpression favours CD38 expression, which is deleterious for patients by enhancing malignant progression. As therapeutic monoclonal antibodies targeting CD38 are already used in clinics to treat other leukemias, this work brings the evidence of their potential usefulness against refractory HCL cases expressing this marker.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
INTRODUCTION.....	5
I. La leucémie à tricholeucocytes	5
1. Les Caractéristiques de la pathologie	5
2. Les améliorations du diagnostic.....	7
3. Les formes variantes de l'HCL	8
4. L'HCL : une leucémie facilement curable ?	9
a. Les premiers traitements.....	9
b. Les analogues de purines : la panacée ?.....	10
c. Maladie résiduelle et récurrence de l'HCL : causes et mécanismes potentiels de persistance.	11
d. Nouvelles pistes thérapeutiques : l'avènement des thérapies ciblées.....	13
i. Les anticorps monoclonaux.....	14
ii. Les inhibiteurs de B-Raf V600E.....	15
II. Dérégulation de la signalisation cellulaire dans l'HCL.....	16
1. La voie Ras-Raf-MAPK	17
a. Les mutations de BRAF	19
b. L'axe Mek-Erk	20
2. La voie du BCR.....	22
a. Rôle du BCR	22
b. La signalisation du BCR	22
c. Altérations de la voie du BCR et ciblage de sa signalisation dans l'HCL	23
3. Les Rho-GTPases	25
a. Caractéristiques et classification	25
b. Fonctions physiologiques des Rho-GTPases dans les cellules hématopoïétiques.....	27
c. Dérégulation des Rho-GTPases dans l'HCL	28
4. La protéine RhoH	31
a. Une Rho-GTPase atypique	31
b. Un rôle ambivalent	32
c. Anomalies de RhoH dans les hémopathies malignes	33
III. CD38 : bien plus qu'un marqueur de différenciation	34
1. Le gène <i>CD38</i>	35
2. Régulation de l'expression du gène <i>CD38</i>	35
a. Régulation transcriptionnelle	35
i. Dans les cellules musculaires lisses des voies aériennes.....	35
ii. Dans les cellules myéloïdes	36
iii. Dans les lymphocytes B	36
iv. Dans les lymphocytes T	36
b. Régulation post-transcriptionnelle.....	37
3. La protéine CD38.....	38
4. Une protéine à activité pléiotropique.....	39
a. Un récepteur de surface	39
b. Une ectoenzyme	42

c. Une molécule d'adhérence.....	45
5. CD38 hors de la sphère hématologique.....	46
IV. CD38 dans les hémopathies malignes :	48
1. CD38 dans la Leucémie Aigue Myéloïde	48
2. CD38 dans le Myélome Multiple.....	49
3. CD38 dans les lymphomes B	51
4. CD38 dans la Leucémie Lymphoïde Chronique.....	52
a. Du marqueur à l'acteur.....	52
b. Considérations thérapeutiques	54
OBJECTIFS.....	56
MATERIELS ET METHODES	57
I. Techniques de biologie cellulaire	57
1. Culture cellulaire	57
2. Réactifs.....	57
3. Transfections.....	58
4. Invalidation du gène <i>CD38</i> par la technique des <i>Zinc Finger Nucleases</i> (ZFNs)	58
5. Cytométrie en flux	59
II. Techniques de biologie moléculaire	60
1. PCR	60
a. Extraction des ARN totaux.....	60
b. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)	60
c. qRT-PCR	60
i. Chimie Taqman	60
ii. Chimie SYBr Green	61
2. Clonage du promoteur du gène <i>CD38</i>	62
a. Clonage dans le vecteur pCR2.1-TOPO	63
i. Amplification et purification des fragments d'ADN	63
ii. Ligature des fragments d'ADN dans le vecteur pCR2.1-TOPO	63
iii. Transformation bactérienne	63
iv. Vérification du sens d'insertion des fragments clonés et amplification du plasmide.....	64
v. Amplification du plasmide et isolement des fragments d'ADN	65
b. Clonage des fragments de promoteur dans le vecteur pGL4.14 [Luc2/Hygro]	66
i. Préparation du vecteur : linéarisation et déphosphorylation	66
ii. Ligature entre pGL4.14 et les fragments du promoteur du CD38.....	66
iii. Vérification par séquençage nucléotidique de l'absence de mutation dans les fragments d'ADN insérés dans les plasmides recombinants	67
c. Clonage du fragment CD38-RA	67
i. Amplification des fragments d'intérêt	68
ii. PCR « long-range »	68
iii. Technique de clonage « InFusion [®] ».....	69
d. Transfection transitoire des plasmides dans les lignées cellulaires HCL	69
III. Techniques de biochimie	70
1. Dosage de protéines	70

2.	Western Blot	71
a.	Fractionnement cellulaire.....	72
b.	Extraction des protéines et mesure des activités luciférase et β -galactosidase par chimiluminescence.....	73
i.	Contrôle β -galactosidase.....	73
ii.	Contrôle Renilla Luciférase.....	74
IV.	Techniques de biologie fonctionnelle	75
a.	Test d'adhérence lymphocytaire sur tapis cellulaire endothélial.....	75
b.	Test de migration lymphocytaire transendothéliale	75
c.	Mesure de l'apoptose.....	76
d.	Mesure de la prolifération cellulaire	76
e.	Mesure de la croissance des cultures cellulaires.....	77
f.	Mesure des flux calciques intracellulaires	77
V.	Manipulations <i>in vivo</i>	77
a.	Conditions d'élevage	77
b.	Mesure de la croissance des tumeurs induites <i>in vivo</i>	78
VI.	Analyses <i>in silico</i>	78
a.	Recherche de sites de liaison de microARNs.....	78
b.	Recherche de protéines tronquées potentiellement fonctionnelles générées par genome editing ..	79
RESULTATS		80
I.	Régulation du gène <i>CD38</i> par la protéine RhoH dans l'HCL	80
1.	Validation des données du transcriptome sur la répression du gène <i>CD38</i> par RhoH	80
2.	Régulation de l'activité promotrice du gène <i>CD38</i> par RhoH	81
a.	Expression des transcrits <i>CD38</i> et activité promotrice dans les lignées cellulaires HCL	81
b.	Rationnel du choix des constructions produites	83
c.	Modulation de l'expression de <i>CD38</i> par des stimuli extracellulaires dans le modèle JOK-E / JOK-R.	84
d.	Influence de RhoH sur l'activité promotrice du gène <i>CD38</i>	86
3.	Le facteur de transcription Smad1.....	88
a.	Données transcriptomiques	88
b.	RhoH réprime l'expression de Smad1 dans le modèle JOK-E/JOK-R	89
i.	90
ii.	90
c.	Recherche bioinformatique de sites de fixation de Smad1 sur le promoteur du gène <i>CD38</i>	90
d.	Expression transitoire de Smad1 dans la lignée JOK-1 parentale.....	92
4.	Hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle du gène <i>CD38</i> par RhoH	93
a.	RhoH semble diminuer la stabilité des ARNm <i>CD38</i>	93
b.	Technique de « run-off »	95
c.	Recherche bioinformatique de microARNs ciblant <i>CD38</i>	96
d.	Recherche de sites potentiels de liaison de facteurs trans stabilisant ou déstabilisant l'ARNm <i>CD38</i>	97
e.	Etude des facteurs trans AUF-1, HuR et TTP dans le modèle JOK-E/JOK-R	99
II.	Impact de <i>CD38</i> sur la progression tumorale de la leucémie à tricholeucocytes	101
1.	Expression de <i>CD38</i> dans les lignées cellulaires lymphoïdes B.....	102
2.	Invalidation de <i>CD38</i> dans les lignées cellulaires JOK-1 et HC-1.....	103
a.	Stratégies d'invalidation	103

b.	Génération des lignées cellulaires JOK-1 et HC-1 KO pour l'expression de CD38	103
c.	Validation du KO du gène CD38 dans les clones cellulaires JOK-1	105
d.	Validation de l'absence d'effets « OFF-Target »	109
e.	Validation du KO du gène CD38 dans de potentiels clones cellulaires HC-1	109
3.	CD38 favorise la croissance des lignées cellulaires HCL <i>in vitro</i>	111
4.	CD38 ne modifie pas la prolifération des cellules HCL <i>in vitro</i>	112
5.	CD38 favorise la survie des cellules HCL	113
6.	CD38 ne modifie pas les flux calciques intracellulaires dans les cellules HCL	114
7.	CD38 favorise l'adhérence à l'endothélium <i>in vitro</i>	116
8.	CD38 module la migration transendothéliale <i>in vitro</i>	117
9.	CD38 favorise la progression tumorale <i>in vivo</i>	118
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....		121
1.	Etude de la régulation de l'expression du gène <i>CD38</i> par RhoH	122
2.	CD38 favorise la progression tumorale de l'HCL	124
3.	CD38 : un marqueur de mauvais pronostic et une cible thérapeutique dans l'HCL	129
CONCLUSION GENERALE		134
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		136
ANNEXES		156
1.	Annexe 1 : Cartes des vecteurs plasmidiques.	156
2.	Annexe 2 : Tableau récapitulatif des amorces de PCR utilisées.	160
3.	Annexe 3 : Extrait du protocole du kit « <i>In-Fusion HD Cloning</i> »	161
4.	Annexe 4 : Résultats du logiciel <i>TargetScan</i>	162
5.	Annexe 5 : Résultats de la recherche de sites potentiels avec le logiciel TarBase	163
6.	Annexe 6 : Certificats d'analyse des lignées cellulaires HCL	164
7.	Annexe 7 : Principe de la technique utilisant les ZFNs	169
8.	Annexe 8 : Site de liaison des ZFNs sur le gène <i>CD38</i>	170
9.	Annexe 9 : Tableau récapitulatif des séquences <i>OFF-targets</i> potentielles des ZFNs ciblant CD38	171
10.	Annexe 10 : Liste des gènes différemment exprimés entre les lignées JOK-E et JOK-R.	172

LISTE DES ABREVIATIONS

A

- **AA** : *Acides amines*
- **AcONa** : Acétate de sodium
- **ADCC** : *Antibody dependant cell mediated cytotoxicity*
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **ADNc** : ADN complémentaire
- **ADNg** : ADN génomique
- **ADO** : Adénosine
- **ADPR** : Adénosine di-phosphate ribose
- **ADPRc** : Adénosine di-phosphate ribose cyclique
- **Amp** : Ampicilline
- **AMPK** : *AMP-activated protein Kinase*
- **AP-1** : *Activator Protein 1*
- **ARE** : *AU-rich elements*
- **ARN** : Acide ribonucléique
- **ARNm** : ARN messagers
- **ATRA** : *All-trans retinoic acid*
- **AUF-1** : *AU-rich factor 1*

B

- **BAFF** : *B-cell activating factor*
- **BCECF-AM** : *2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester*
- **BCR** : *B-cell receptor*
- **BET** : Bromure d'éthidium
- **BMP** : *Bone morphogenic protein*
- **BSA** : *Bovine Serum Albumin*
- **Btk** : *Bruton's tyrosine kinase*

C

- **CDC** : *Complement dependant cytotoxicity*
- **CDR** : *Complementary determining region*
- **ChIP** : *Chromatin immunoprecipitation*
- **CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité
- **CREB** : *cAMP response element binding protein*
- **Ct** : *Cycle at threshold*

D

- **DAG** : Di-acyl-glycérol
- **DLBCL** : *Diffuse Large B Cell Lymphoma*
- **DMEM** : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- **DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- **dNTP** : désoxynucléotides tri-phosphate
- **DTT** : Dithiothréitol

E

- **EdU** : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
- **EMDR** : *Environmental mediated-drug resistance*
- **EMSA** : *Electromobility shift assay*
- **Erk** : *Extracellular signal-Regulated Kinase*

F

- **FAM** : *6-carboxyfluorescein*
- **FITC** : *Fluorocéine isothiocyanate*
- **FN** : *Fibronectine*

G

- **GAP** : *GTPase Activated Protein*
- **GDI** : *GDP Dissociation Inhibitor*
- **GDP** : *guanosine di-phosphate*
- **GEF** : *Guanine Exchange Factor*
- **GRE** : *Glucocorticoid Response Element*
- **GTP** : *Guanosine tri-phosphate*

H

- **HA** : *Hyaluronate*
- **HBSS** : *Hank's Balanced Salt Solution*
- **HCL** : *Hairy Cell Leukemia*
- **HCL_{ju}** : *HCL Japanese-variant*
- **HCL_v** : *HCL variant*
- **HMEC-1** : *Human Mammary Endothelial Cell-1*
- **HMS** : *Hypermutations somatiques*

I

- **IFN- α** : *Interféron α*
- **Ig** : *Immunoglobuline*
- **IL-X** : *Interleukine-X*
- **IP** : *Iodure de propidium*
- **IP3** : *Inositol-3-phosphate*
- **IP₃** : *Inositoltriphosphate*
- **IPTG** : *Isopropylthiogalactoside*
- **IRF** : *Interferon Response Factor*

J

- **JAK** : *Janus Activated Kinase*
- **JNK** : *Jun N-terminal Kinase*

K

- **KO** : *Knock Out*

L

- **LAK** : Lymphokines activated killers
- **LB** : *Lysogeny broth*
- **LLC** : Leucémie lymphoïde chronique
- **LPS** : LipoPolySaccharide
- **Lyn** : *Lck/Yes novel tyrosine kinase*

M

- **MAPK** : *Mitogen-activated protein kinase*
- **MDSC** : *Myeloid-derived suppressor cells*
- **MEK** : *MAPK/Erk kinase*
- **MGB** : *Minor Groove Binder*
- **Min** : minutes
- **mL** : milliliters
- **MM** : Myélome multiple
- **MRD** : *Minimal residual disease*
- **mTOR** : Mammalian target of rapamycin

N

- **NAADP** : *Nicotinic acid adenine di-phosphate*
- **NAD** : Nicotinamide adénine dinucléotide
- **NADP** : Nicotinamide di-nucléotide phosphate
- **NFAT** : *Nuclear factor of activated T-cells*
- **NF- κ B** : *Nuclear Factor of kappa-B*
- **NK** : *Natural killer*
- **NMD** : *Nonsense-mediated mRNA decay*
- **NSG** : *Nod-Scid gamma*

P

- **PBS** : *Phosphate Buffer Saline*
- **PC-1** : *Plasma cell-1*
- **PCR** : *Polymerization chain reaction*
- **pb** : paire de bases
- **PE** : Phycoérythrine
- **PI3K** : *Phosphatidyl inositol-3 Kinase*
- **PKC** : Protéine kinase C
- **PLC** : Phospholipase C
- **PTC** : *Premature-termination codon*

Q

- **qRT-PCR** : *quantitative real-time polymerization chain reaction*

R

- **RARE** : *Retinoic Acid Response Element*
- **RBP** : *RNA-binding protein*
- **RC** : rémission complète

- **RCPG** : Récepteur couplé aux protéines G
- **RPMI** : Roswell Park Memorial Institute
- **RTK** : Récepteur à tyrosine kinase

S

- **SBE** : *Smad binding elements*
- **sec** : *seconds*
- **SMZL** : *Splenic Marginal Zone Lymphoma*
- **SOC** : *Super optimal broth*
- **SOS** : *Son of Sevenless*
- **SRPL** : *Splenic red pulp lymphoma*
- **STAT** : *Signal Transducers and Activators of Transcription*
- **SVF** : *Sérum de Veau Fœtal*
- **Syk** : *Spleen tyrosine kinase*

T

- **TA** : *Température ambiante*
- **TCF- α** : *T-cell factor- α*
- **TCR** : *T cell receptor*
- **TGF** : *Transforming growth factor*
- **TLR** : *Toll-like receptor*
- **TNF- α** : *Tumor Necrosis Factor α*
- **TRAP** : *Tartrate resistant acide phosphatase*
- **TTP** : *Tristetraproline*

U

- **U** : *Unites internationales*
- **UI** : *Unités Internationales*
- **UTR** : *Untranslated Region*
- **UV** : *Ultraviolets*

V

- **VEGF** : *Vascular Endothelial Growth Factor*

W

- **WT** : *Wild-Type*

X

- **X-Gal** : *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside*

Z

- **ZAP-70** : *Zeta associated protein-70*
- **ZFN** : *Zinc Finger Nuclease*

INTRODUCTION

I. La leucémie à tricholeucocytes

1. Les Caractéristiques de la pathologie

Décrite en 1958[1], la leucémie à tricholeucocytes (ou HCL pour *Hairy Cell Leukemia*) est une hémopathie maligne B chronique. Elle représente 2% des leucémies et touche une population moyennement âgée avec une médiane à 50 ans. Elle présente une forte prédisposition chez l'homme, avec une prévalence de 5 hommes pour 1 femme [2]. Cette hémopathie maligne est caractérisée par une infiltration médullaire et splénique de cellules lymphoïdes présentant des protrusions cytoplasmiques, leur donnant un aspect « chevelu ». (cf. **Figure 1**).

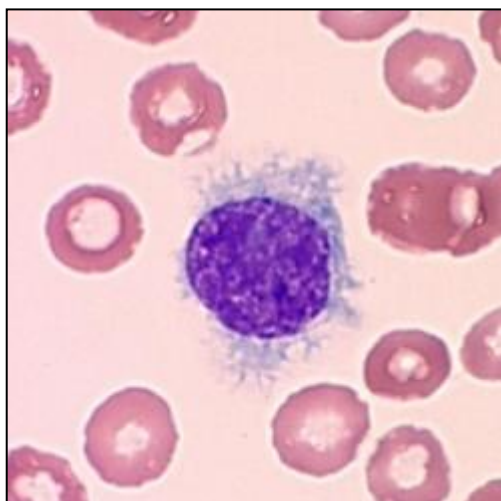


Figure 1 : Image au microscope à immersion d'un tricholeucocyte sur une lame d'échantillon sanguin. On distingue très nettement les protrusions cytoplasmiques. Tiré de Grever [3].

La maladie est très souvent indolente pendant les stades précoces. Les patients présentent le plus souvent au diagnostic une faiblesse générale et une fatigue accrue, de la fièvre, une douleur latérale correspondant à une splénomégalie importante, et sont habituellement sans adénopathies périphériques. Ces symptômes sont souvent accompagnés d'une hépatomégalie, et plus rarement de saignements, d'une vasculite et de troubles neurologiques et squelettiques. Le bilan hématologique révèle une pancytopénie avec une monocytopénie caractéristique (favorisant la survenue d'infections récurrentes ou sévères), une anémie ainsi que, le plus souvent, une faible quantité de cellules néoplasiques circulantes

[4]. L'analyse de l'hémogramme permet l'observation de ces cellules « chevelues ». Les cellules leucémiques infiltrent principalement la moelle osseuse et la pulpe rouge de la rate. La biopsie médullaire, nécessaire en cas d'échec de l'hémogramme, est ardue, car la moelle osseuse des patients est très fibreuse [5].

La question de l'origine cellulaire précise de cette maladie reste controversée. Trois hypothèses se confrontent. La première est la plus probable, et défend une parenté des tricholeucocytes avec des lymphocytes B pré-plasmatisés issus du centre germinatif du ganglion. En effet, les cellules HCL présentent dans la plupart des cas des hypermutations somatiques canoniques dans la région CDR (*Complementary determining region*) des gènes *IGHV* des chaînes lourdes des immunoglobulines (Ig) [6], [7]. En ce sens, les travaux de Basso *et al* [8] ont montré un profil d'expression génique similaire entre les tricholeucocytes et les lymphocytes B mémoires. Leur étude, menée par *RNA microarrays*, a montré une plus forte proximité des cellules HCL avec les lymphocytes B mémoires qu'avec les cellules du centre germinatif, ainsi qu'un profil d'expression bien distinct de celui de la LLC (Leucémie Lymphoïde Chronique), cependant elle aussi apparentée aux cellules B mémoires [9]. Outre l'expression du CD27, les cellules de patients atteints de tricholeucocytose possèdent un profil d'expression de gènes de prolifération, d'apoptose, d'activation et de métabolisme de l'ADN similaire à celui des lymphocytes B mémoires (cf. **Figure 2**).

Cependant, les tricholeucocytes présentent plus de mutations dans leur CDR que les cellules de leucémie prolymphocytaire B (prégerminatives) mais moins que celles de myélome multiple [10]. Il est donc difficile d'assurer avec certitude que la transformation leucémique de l'HCL ait lieu après passage dans ce centre germinatif et non en son sein (cf. **Figure 2**).

Une seconde hypothèse proposant une origine histiocyttaire a également été soulevée, du fait de la capacité des tricholeucocytes à phagocyter des billes de latex [11]. Mais cette proposition n'a pas été étayée par les données moléculaires [8] (cf. **Figure 2**).

Enfin, une étude récente montre que des précurseurs lymphoïdes présentant une altération génétique prépondérante dans la pathologie (la mutation *BRAF* V600E, décrite plus loin, p. 19) sont détectés chez les patients et sont capables d'induire une leucémie présentant les caractéristiques de l'HCL dans un modèle murin. A l'inverse, l'expression conditionnelle en système Cre-lox du gène *BRAF* altéré dans des cellules B murines différenciées est incapable de reconstituer ce phénotype leucémique [12]. Cette dernière hypothèse argumente donc en faveur d'une origine de la maladie dès les précurseurs hématopoïétiques lymphoïdes (cf. **Figure 2**).

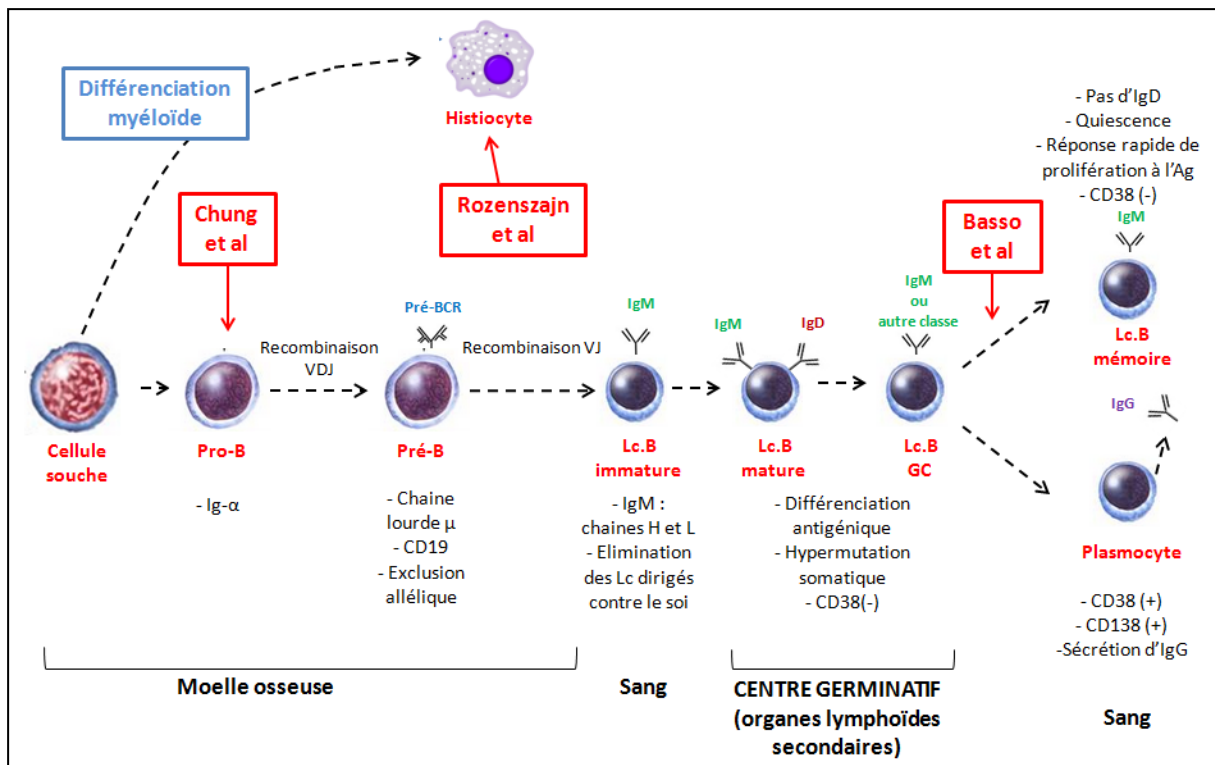


Figure 2 : Schéma explicatif de l'origine controversée de l'HCL. Les encadrés rouges indiquent les différentes sources formulant une hypothèse sur l'origine du développement de l'HCL. Lc : Lymphocyte.

2. Les améliorations du diagnostic

Le diagnostic précis de cette maladie est le plus souvent délicat, car les symptômes cliniques et les caractéristiques morphologiques des cellules favorisent la confusion avec d'autres hémopathies malignes, tel le lymphome splénique de la zone marginale (SMZL) ou le lymphome splénique de la pulpe rouge (SRPL) [13]. L'hémogramme, révélant les cellules « chevelues », reste le premier élément de diagnostic. La coloration cytochimique d'intérêt, celle de l'acide phosphatase tartrate-résistante (TRAP), est positive. L'immunophénotype constitue un outil incontournable dans la précision du diagnostic. En effet, outre le CD19, les tricholeucocytes expriment fortement le CD20, le CD22 et le CD11c de même que le CD103, le CD25 et le CD123. De plus, l'expression de l'annexine A1 est spécifique de l'HCL [4].

Afin de déterminer de manière formelle si un patient présente un statut HCL ou non, le *Score Royal Marsden* est utilisé, correspondant à l'expression des 4 principaux marqueurs de surface typiques de l'HCL (CD11c, CD25, CD103 et CD123). L'expression d'un de ces marqueurs attribue un point, sinon zéro. L'obtention d'un score élevé (3 ou 4) permet de classer le patient parmi les porteurs d'HCL [14].

Tiacci *et al* ont découvert (par *whole-exome sequencing*, confirmé par séquençage Sanger) la présence de la mutation V600E du gène *BRAF* chez une large majorité de patients HCL [15]. Ce gène code un proto-oncogène, activant de manière exacerbée des voies de signalisation cellulaire importantes dans le développement de la leucémie (que nous détaillerons plus loin, p. 19). Cette mutation a été proposée comme un des événements d'initiation de la maladie et est absente dans les autres hémopathies malignes B. Cependant, bien que les premières études décrivent *BRAF* comme muté dans 100% des cas d'HCL [15]–[17], un nombre notable de publications a montré l'absence de cette mutation jusque dans 21% des cas selon les études, et particulièrement chez les patients en rechute [18]–[22]. L'universalité de la mutation *BRAF* V600E est donc à relativiser. Le génotypage n'est donc pas une technique essentielle à la précision du diagnostic et est d'ailleurs peu utilisé en clinique.

3. Les formes variantes de l'HCL

Une forme variante de la maladie représente 10 à 20% des cas d'HCL diagnostiqués. Sa médiane d'âge de 71 ans est plus élevée que celle de l'HCL classique. Les cellules présentent le même aspect chevelu que pour l'HCL classique, mais sont plus petites. L'HCL variant (HCLv) possède des caractéristiques cliniques très proches de l'HCL classique, notamment la splénomégalie mais les patients présentent une leucocytose plus importante et sans neutro- ou monocytopenie. Dans ce cas, la moelle osseuse hypercellulaire est facilement aspirable par ponction sternale. D'autre part, l'HCLv présente un pronostic clinique plus sombre, avec une médiane de survie de 9 ans et 15% de survie à 15 ans [23].

Les cellules HCLv présentent des singularités au niveau de l'analyse en cytométrie en flux. Elles partagent avec l'HCL classique l'expression du CD19, du CD11c, du CD20, du CD103, du CD22 mais n'expriment ni le CD25 ni l'annexine A1, rendant plus facile le diagnostic différentiel. Le CD123 est rarement exprimé (9% des cas) [24]. La coloration TRAP est très faible. De plus, d'un point de vue moléculaire, les cellules HCLv ne présentent jamais la mutation *BRAF*V600E [18]. Enfin, la réponse de cette forme variante aux traitements de référence de l'HCL est bien moins bonne que pour la forme classique [24], comme nous le verrons dans le paragraphe ci-après. L'ensemble de ces différences ont conduit l'Organisation Mondiale de la Santé à classer l'HCLv comme une entité propre, indépendante de l'HCL classique. Nous ne l'aborderons donc pas d'avantage dans ce manuscrit.

Il est à noter qu'une autre forme variante d'HCL a été décrite comme endémique au Japon, où les formes classique et variante d'HCL sont rares. Ce variant japonais (HCLjv) est caractérisé par une splénomégalie, une leucocytose et une moelle osseuse facilement aspirable (semblable à l'HCLv). L'observation au microscope révèle les mêmes caractéristiques morphologiques que les autres formes d'HCL. La coloration TRAP est négative. La cytométrie en flux révèle une expression du CD11c et du CD22 mais pas du CD25 (comme dans l'HCLv), ni du CD103 (présent dans les 2 autres sous-types). Son évolution est indolente à la manière de l'HCL classique [25].

4. L'HCL : une leucémie facilement curable ?

Bien que la maladie ait une évolution clinique lente, les symptômes de l'HCL peuvent amener à mettre en péril la vie du patient (forte cytopénie conduisant à la survenue de maladies opportunistes) et nécessitent l'administration d'un traitement. Sur les 30 dernières années, la prise en charge de l'HCL a beaucoup évolué, avec des résultats efficaces, améliorés sans cesse par les découvertes issues de la recherche fondamentale sur les mécanismes moléculaires de l'établissement et de la progression de la maladie.

a. Les premiers traitements

Sans traitement, la médiane de survie était de 4 ans dans les années 1960 [3]. Afin d'augmenter le nombre de globules blancs et de plaquettes chez les patients dont la pancytopenie devenait trop grave, la splénectomie était alors envisagée car les tricholeucocytes infiltrent massivement la pulpe rouge de la rate. Cet organe constitue donc une niche de développement de la maladie. Ce n'est qu'en 1984 qu'une chimiothérapie efficace contre l'HCL a vu le jour, avec l'utilisation de l'interféron- α (IFN- α) [26]. Cette molécule est une cytokine sécrétée en cas d'infection et stimulant le système immunitaire. Cependant, la mort des tricholeucocytes n'est pas directement liée à l'activation des cellules NK (*Natural Killers*) et le rôle immunoactivateur de l'IFN- α n'est donc pas responsable de l'élimination des cellules, suggérant plutôt son rôle direct [27]. Un mécanisme proposé suite à une étude sur la lignée cellulaire HCL ESKOL est que l'IFN- α diminuerait la sécrétion autocrine de TNF- α par les tricholeucocytes, ce qui limiterait leur survie et leur prolifération. Le traitement à l'IFN- α permettait d'atteindre 80% de réponse complète (RC) dans le sang, mais pas dans la moelle osseuse [28]. Cette réponse à l'IFN- α chez les patients n'était donc souvent que partielle et de courte durée (la rémission complète est considérée comme atteinte

lorsque le taux d'hémoglobine chez les patients est redevenu supérieur à 12 g/L, que le nombre de granulocytes est repassé au dessus du seuil de 1500/ μ L et celui des plaquettes de 100 000/ μ L) [3].

b. Les analogues de purines : la panacée ?

L'introduction des analogues de purines a lieu très rapidement après l'utilisation de l'interféron. Ces molécules sont des anti métabolites, c'est-à-dire des composés dont la structure mime les bases de l'ADN. Leur mode d'action consiste en leur incorporation à l'ADN par l'ADN polymérase II, introduisant des erreurs en série lors de la réplication de l'ADN et aboutissant à la mort de la cellule par apoptose due à cette accumulation de mutations.

Le premier analogue de purines à être introduit a été la pentostatine (ou déoxycoformycine, cf. **Figure 3**). Elle a rapidement montré une efficacité redoutable sur les tricholeucocytes, en induisant chez les patients 75 à 89% de RC [29]–[31]. Un autre analogue de purine, la cladribine (2-chlorodéoxyadénosine, cf. **Figure 3**), a elle aussi montré une efficacité remarquable, permettant d'atteindre 91% de RC [13], [32], [33]. L'étude rétrospective la plus récente sur 16 ans a montré une efficacité équivalente des 2 molécules, avec un taux de RC de 80% [34].

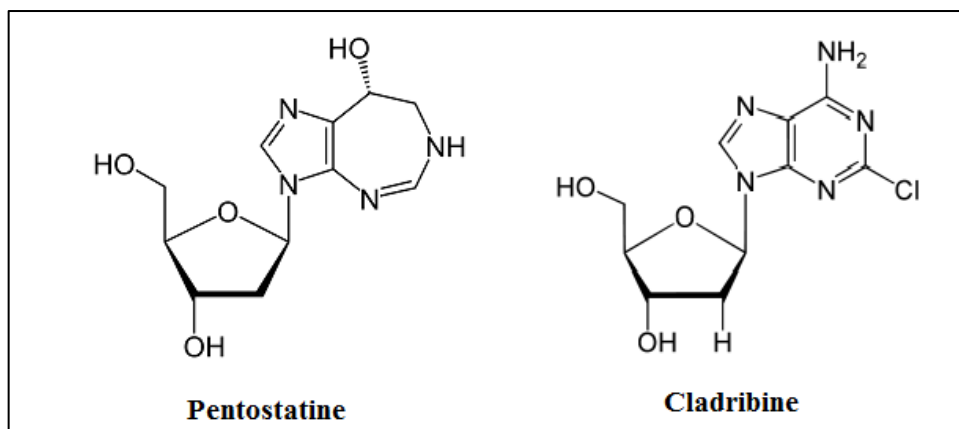


Figure 3 : Structure chimique de la pentostatine et de la cladribine.

L'efficacité impressionnante de ces molécules a grandement facilité la prise en charge de la maladie, et classe l'HCL parmi les leucémies les mieux traitées. Les analogues de purines sont devenus la première ligne de traitement incontestée de l'HCL. Même lors de rechutes, la pentostatine et la cladribine restent efficaces dans la plupart des cas. Cependant, une part notable (environ 20%) des patients sont intrinsèquement réfractaires à ces composés. Else *et al* ont montré que 48% des patients rechutaient, et qu'après une seconde ou troisième

ligne de traitement, une proportion grandissante de patients devenait réfractaire aux analogues de purines [34]. De plus, une partie des patients HCL arborant un répertoire de réarrangement particulier de la chaîne lourde des immunoglobulines (IGHV4-34) a montré également une résistance accrue à ces molécules [35].

c. *Maladie résiduelle et récidive de l'HCL : causes et mécanismes potentiels de persistance.*

La récidive dans l'HCL est due à la présence de cellules soit résistantes au traitement, soit protégées dans des niches physiologiques leur permettant d'échapper aux chimiothérapies.

Ces cellules dans l'organisme du patient en RC constituent la maladie résiduelle (nous utiliserons l'abréviation MRD pour *Minimal Residual Disease*). La définition biologique de la MRD est délicate ; son évaluation a été testée par cytométrie en flux, immunohistochimie et PCR. Dès lors, la sensibilité de détection est différente et le taux de MRD présent chez les patients en rémission complète stable peut aller de 13 à 80%.

La question de l'intérêt de chercher à éradiquer cette MRD s'est posée, car les patients en RC avec une absence apparente de MRD ont une survie sans progression de la maladie plus longue que les autres [36]. Cependant, tuer les dernières cellules leucémiques nécessite le maintien d'une chimiothérapie sur des individus dépourvus de symptômes cliniques. Ceci peut également se révéler risqué pour eux, par la survenue d'effets indésirables ou d'une immunosuppression prolongée [3]. De plus, le maintien d'une chimiothérapie sur le long terme est couteux avec un faible bénéfice thérapeutique. Enfin, le lien clair entre MRD et rechute est encore sujet à controverse [36]. Ainsi, l'étude de Sigal *et al* montre que, 18 ans après le diagnostic, 10 patients suivis sur 19 présentent une MRD détectable sans rechute hématologique³⁴.

La localisation préférentielle des tricholeucocytes dans la moelle osseuse et dans la rate, ainsi que la forte myélofibrose chez les patients, laissent penser à un rôle important du microenvironnement tumoral dans le développement de l'HCL. Ce paradigme du rôle du microenvironnement dans la leucémogénèse est de plus en plus pris en compte comme potentielle source de nouvelles cibles thérapeutiques dans les hémopathies malignes B. En effet, la moelle osseuse et la rate peuvent fournir des niches de développement de la maladie en offrant un environnement propice à l'émission de signaux de survie et de prolifération cellulaire. De même, ces niches protectrices permettraient aux cellules leucémiques d'échapper aux traitements (moindre perfusion par le sang donc moindre accessibilité des

cellules aux molécules de chimiothérapies, protection par des cellules accessoires...). Par exemple, l'interaction entre les cellules de myélome multiple et les cellules stromales active les voies NF- κ B, Notch et Myc, favorisant la survie cellulaire et la résistance aux traitements [37].

L'ensemble des mécanismes assurant la survie des cellules leucémiques dans leur niche constitue l'EMDR (*Environmental Mediated Drug Resistance*). Dans le cas de l'HCL, les interactions mises en jeu sont décrites dans la **Figure 4**, et font intervenir les intégrines, les cytokines, les macromolécules de la matrice extracellulaire et les cellules du microenvironnement médullaire. La moelle osseuse étant le principal site de présence du HA (hyaluronate) et les cellules du stroma médullaire exprimant la FN (fibronectine), les molécules d'adhérence cellulaire (CD44, CD49d/e) permettent aux cellules leucémiques de rester ancrées préférentiellement dans la moëlle [38]. De plus, l'interaction CD44-HA induit la sécrétion autocrine de FN par les tricholeucocytes, favorisant d'autant plus la myélofibrose [39]. Si le microenvironnement peut modifier le devenir des cellules leucémiques, l'inverse est également possible : ainsi, la présence de lymphocytes T possédant un répertoire restreint de TCR (*T Cell Receptor*) suggère une expansion clonale de ces cellules induite par la maladie [40]. Il est à noter que les cellules HCL expriment fortement le CXCR4 mais pas d'autres récepteurs aux cytokines permettant une migration vers les ganglions lymphatiques (tels le CXCR5 et le CCR7) [41]. Ceci explique la faible tendance des cellules HCL à se loger dans ces ganglions.

La moelle osseuse et la rate constituent donc des sites privilégiés pour le développement d'une MRD dans l'HCL. Alors que les traitements aux analogues de purines détruisent la majorité des cellules leucémiques dans le sang, les microenvironnements médullaire et splénique sont des lieux d'interactions permettant à une faible fraction de cellules de résister aux chimiothérapies et de persister dans ces niches. Ces cellules entretiendront une MRD, augmentant le risque de rechutes [42].

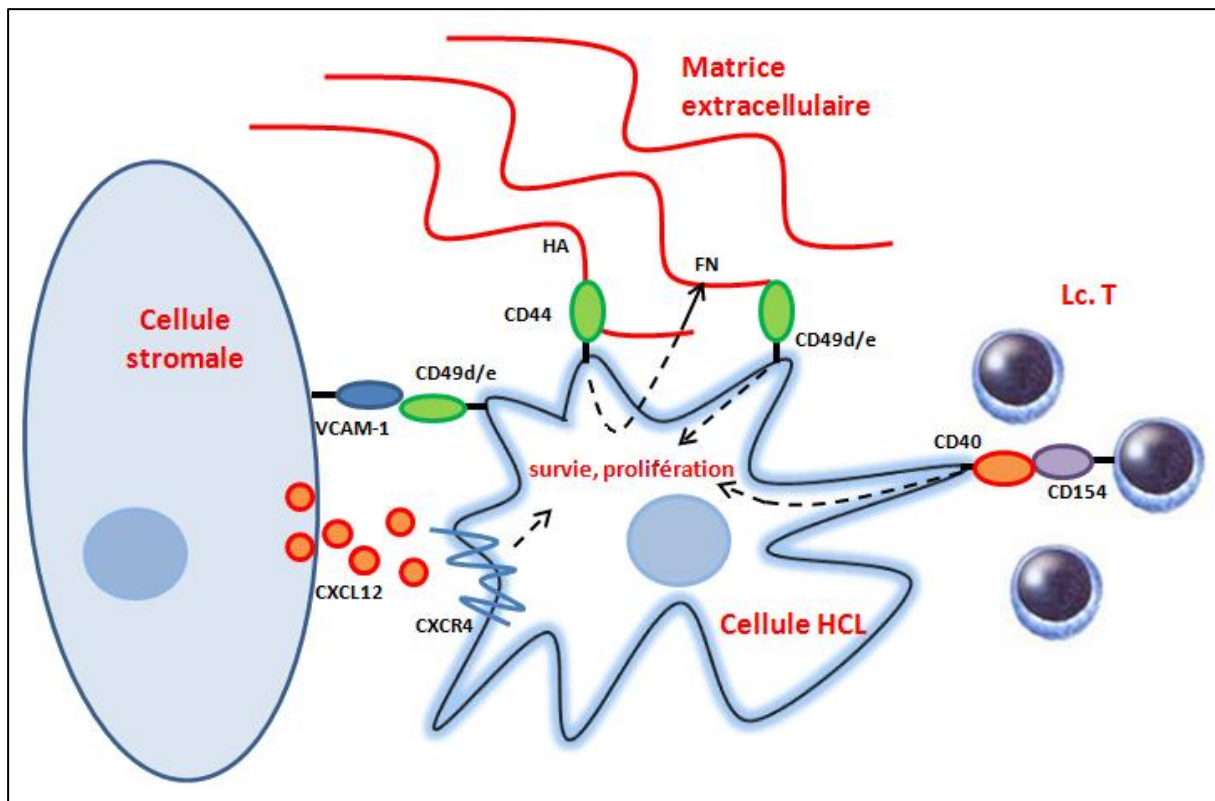


Figure 4 : Schéma synthétique du concept d'EMDR dans l'HCL. L'interaction des intégrines avec leur ligand augmente l'adhérence des cellules leucémiques à leur niche. Le hyaluronate et la fibronectine de la matrice extracellulaire augmente aussi cette adhérence par interaction avec le CD44 et le CD49d/e, respectivement, et induit également la transduction de signaux cellulaires. Les cellules stromales sécrètent du CXCL12, activant le CXCR4 et les lymphocytes T expriment le CD154, ligand du CD40. Ces 2 interactions favorisent la survie et la prolifération des cellules leucémiques. HA : hyaluronate, FN : fibronectine, Lc. T : lymphocytes T. Inspiré de Burger *et al* [42].

Dans ce contexte, l'utilisation de molécules inhibitrices de l'interaction de CXCR4 avec ses ligands (tel le plerixafor ou AMD3100) pourrait constituer une voie thérapeutique susceptible d'aider à diminuer les interactions entre les tricholeucocytes et leur microenvironnement, les rendant plus sensibles aux chimiothérapies. Une telle stratégie est actuellement envisagée dans le traitement de la LLC. Cependant, de telles molécules peuvent aussi agir sur les progéniteurs hématopoïétiques, ce qui pourrait aboutir à des effets indésirables graves et une forte immunosuppression [42].

d. Nouvelles pistes thérapeutiques : l'avènement des thérapies ciblées

Afin de prendre en charge les cas d'HCL réfractaires aux analogues de purines ou d'allonger la RC sans nécessité de traitement, des recherches de nouvelles thérapies dans l'HCL ont été menées ces dix dernières années, et ont abouti à l'émergence de thérapies

ciblées, dues à une meilleure connaissance des caractéristiques moléculaires et biologiques de la maladie.

i. Les anticorps monoclonaux

L'arrivée sur le marché des anticorps monoclonaux a permis d'améliorer significativement la prise en charge des HCL réfractaires. Ces anticorps thérapeutiques ciblent des molécules exprimées à la surface des cellules leucémiques, et induisent une réponse immunitaire sous 3 formes : ADCC, CDC et ADPC.

L'ADCC (*Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity*) augmente l'action des cellules de l'immunité à activité cytolytique (principalement les cellules NK et T cytotoxiques, mais aussi les monocytes et les macrophages) par reconnaissance du fragment Fc de l'anticorps lié à sa cible. Il se produit alors une réponse cellulaire provoquant la lyse des cellules malignes (libération de molécules de perforine, de granzyme et d'enzymes lytiques).

La CDC (*Complement Dependent Cytotoxicity*) consiste en l'opsonisation de la cellule leucémique par les molécules du complément, qui reconnaissent le fragment Fc de l'anticorps. Ceci induit la cascade du complément aboutissant à la formation du complexe MAC (*Membrane Attack Complex*) et à la lyse cellulaire.

L'ADCP (*Antibody Dependent Cell Phagocytosis*) nécessite aussi la reconnaissance du fragment Fc de l'anticorps par les monocytes et macrophages. La cellule cible sera alors détruite par phagocytose.

Par liaison sur les molécules réceptrices, ces anticorps monoclonaux peuvent également induire une signalisation cellulaire dépendante du récepteur et induisant la mort des cellules ciblées, sans l'intermédiaire du système immunitaire.

Le principal anticorps monoclonal utilisé dans le traitement de l'HCL est le Rituximab (Rituxan[®], MabThera[®]). C'est un anticorps chimérique humain/murin de type IgG1 kappa ciblant le CD20, qui est fortement exprimé à la surface des tricholeucocytes. Il a été utilisé avec succès dans le traitement de la LLC [43]. Dans l'HCL, il a été utilisé en monothérapie de première ligne avec des taux de réponse complète allant de 20 à 80% selon les études. En combinaison avec la cladribine, ce taux monte théoriquement à 100%, soit légèrement supérieur à celui obtenu par les analogues de purines seuls [44]. Son intérêt principal réside dans le traitement de l'HCL réfractaire à ces molécules. Selon les études, la réponse complète est atteinte pour ces patients dans 10 à 53% des cas [45]–[47]. De manière intéressante, certaines études ont même décrit une éradication de la MRD par le Rituximab [44], [48].

Une autre stratégie d'utilisation des anticorps en thérapie consiste en l'emploi d'immunotoxines. Ces molécules sont une fusion entre un anticorps ciblant un marqueur membranaire de la cellule leucémique et une toxine bactérienne ou végétale. L'anticorps joue plutôt dans ce cas le rôle d'un vecteur qui va permettre de cibler le plus spécifiquement possible la cellule cancéreuse. Ici, le mode d'action de la thérapie ne s'appuie pas sur les mécanismes de signalisation intrinsèques de type ligand/récepteur, ni sur le recrutement des cellules du système immunitaire associé aux anticorps (ADCC, CDC, ADCP). Une fois lié à la membrane, l'anticorps est internalisé et libère la toxine qui va tuer la cellule par arrêt de la synthèse protéique [2]. Les immunotoxines en cours d'évaluation clinique dans le traitement de l'HCL ciblent le CD25 et le CD22, fortement exprimés par les cellules HCL.

Le LMB-2 est un anti-CD25 couplé à l'endotoxine de *Pseudomonas aeruginosa*. Son évaluation en essai clinique de phase I était prometteuse, mais la possibilité de perte d'expression du CD25 a rapidement conduit à tourner les recherches vers les anticorps ciblant le CD22 [49].

L'immunotoxine dont les effets sont les plus prometteurs est le Moxetumomab Pasudotox (HA22). C'est un anticorps murin anti-CD22 couplé à la toxine de *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agit en fait de l'anticorps BL22, déjà testé en essai clinique dans le traitement de l'HCL avec une réponse complète sur l'HCL réfractaire entre 25% et 50% [50], modifié par mutagenèse afin de diminuer la dissociation du complexe anticorps/récepteur et d'augmenter l'internalisation. Il a montré un taux de RC de 46% chez des patients HCL réfractaires. Après un suivi d'une médiane de 48 mois, les patients ayant atteint la RC ne présentent pas de MRD. Cette molécule est actuellement en évaluation de phase III. Cependant, on note des effets indésirables parfois graves chez les patients (immunogénicité et syndrome hémolytique urémique) [2].

ii. Les inhibiteurs de B-Raf V600E

La découverte par Tiacci *et al* de la mutation *BRAF* V600E dans une majorité de cas d'HCL a ouvert une voie thérapeutique par l'inhibition de cette kinase (cf. p. 19). Le vemurafenib (PLX4032) est un inhibiteur spécifique de cette forme mutée de la protéine B-Raf, utilisé avec succès dans le mélanome métastatique [51]. Cette molécule entre en compétition avec la poche à ATP de la kinase. Des études de cas menées dans l'HCL ont montré son efficacité sur les formes réfractaires, où la RC est alors atteinte [52]–[55]. Un essai clinique de phase II est actuellement en cours. Notons que l'étude clinique de phase III de Chapman *et al* dans le mélanome métastatique a montré des effets indésirables modérés à

graves (asthénie, arthralgie, « rashes » cutanés induits par la photosensibilité) [51]. De plus, Sari *et al* ont montré que certains patients développaient une résistance au vemurafenib, avec seulement une réponse partielle atteinte et la survenue d'effets indésirables graves (arthralgie de grade 3, toxicodermatose). Un autre inhibiteur de B-Raf muté V600E, le dabrafenib, a également montré une activité chez les patients HCL réfractaires aux analogues de purines [56].

La leucémie à tricholeucocytes est une hémopathie maligne pour laquelle les médecins disposent d'une palette large et efficace de thérapies, en première ligne et également en cas de rechute. Cependant, ces excellents résultats présentent des limites : de nombreux patients rechutent avec les traitements conventionnels, mais également avec les nouvelles thérapies [45] . De plus, des phénomènes de résistance sont déjà décrits, même pour les nouvelles molécules les plus efficaces [57]. Par ailleurs, des effets indésirables graves empêchent un certain nombre de patients de pouvoir disposer de ces nouveaux traitements [2]. L'effort de recherche doit donc être maintenu pour trouver des voies thérapeutiques alternatives et améliorer la qualité de vie des patients réfractaires.

Les recherches fondamentales menées sur l'HCL ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette pathologie, et constituent le socle des avancées thérapeutiques accomplies ces dernières années. Toutefois, de nombreuses questions sur la physiopathologie et les facteurs pronostiques de cette leucémie restent à élucider.

II. Dérégulation de la signalisation cellulaire dans l'HCL

L'étude du profil d'expression génique des cellules HCL a permis d'observer des dérégulations d'expression de gènes liés à leur morphologie (tels *LSP1*, *GAS7*...), leur propriétés d'adhérence et de migration vers leurs niches médullaire et splénique (tels *CCR7*, *CXCR5*, *TIMP1*, *TIMP4*, *RECK*...), ainsi qu'à la fibrose médullaire (*IL3RA*, *FLT3*...) [8]. Aucune translocation chromosomique récurrente ne semble avoir été détectée et le profil génomique de la maladie est relativement stable [58]. L'enjeu est donc de déterminer les voies

de signalisation dérégulées expliquant cette altération du profil d'expression génique. Les modifications touchant certaines de ces voies ont été étudiées.

1. La voie Ras-Raf-MAPK

Cette voie de signalisation constitue une des 4 voies dites MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). Les 4 membres sont 1) la voie p38, 2) la voie JNK 3) la voie Erk5/BMK (pour Big MAP Kinase) et 4) la voie Raf-Mek-Erk. Leur schéma d'activation est identique : un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) ou un récepteur à tyrosine kinase (RTK), suite à la fixation d'un ligand (cytokine, hormone, facteur de croissance...) active la protéine G (grande ou petite). Celle-ci va entraîner une cascade de phosphorylation impliquant 3 niveaux successifs de protéines : l'activation des MAP3K (MAP Kinase Kinase Kinase) directement après la grande ou la petite protéine G, puis des MAP2K (MAP Kinase Kinase) et enfin des MAPK (MAP Kinases) qui seront transloquées au noyau afin d'induire l'expression génique [59] (cf. **Figure 5**).

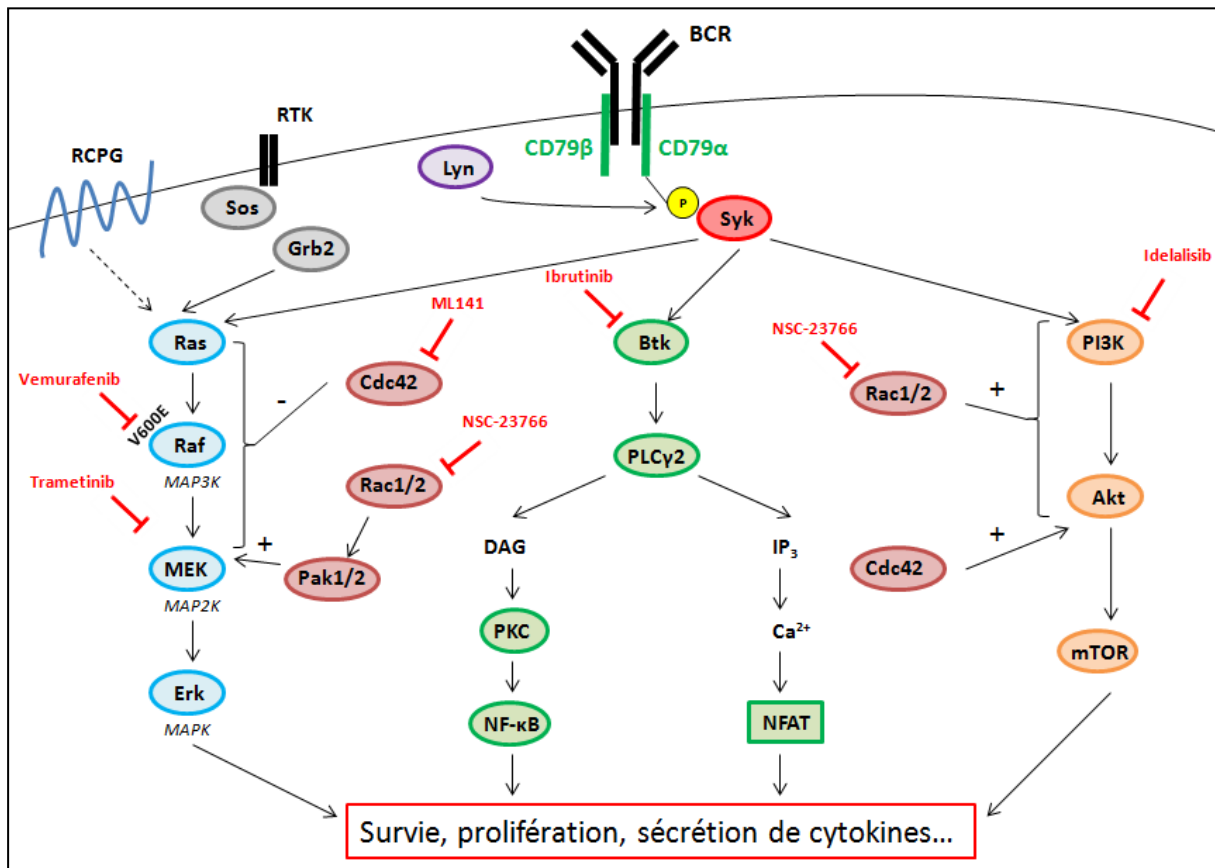


Figure 5 : Les voies de signalisation dérégulées dans l'HCL et les potentielles nouvelles cibles thérapeutiques. Les flèches montrant l'inhibition d'une protéine et le nom de l'inhibiteur correspondant sont indiqués en rouge. Les symboles « + » et « - » indiquent des effets activateurs ou inhibiteurs d'une voie sur une autre. RCPG : récepteur couplé aux protéines G / RTK : récepteur à tyrosine kinase / MEK : MAPK/Erk Kinase / Erk : Extracellular signal-Regulated Kinase / Btk : Bruton's Tyrosine Kinase / PLC : PhosphoLipase C / DAG : DiAcylGlycérol / PKC : Protein Kinase C / IP₃ : Inositol 3-Phosphate / NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells / PI3K : Phosphatidyl inositol-3 Kinase / mTOR : mammalian Target of Rapamycin.

Dans la voie Ras-Raf-Mek-Erk, Ras constitue le premier maillon de la cascade des MAPK, après l'activation du RCPG ou du RTK. C'est la protéine oncogène la plus mutée dans les cancers (33% de mutations dans tous les cancers). Cette petite protéine G est activée par la protéine GEF (*Guanine Exchange Factor*) Sos (*Son of Sevenless*) et la protéine adaptatrice Grb2. La famille Ras comporte 3 membres : K-Ras (85% des cancers avec une mutation somatique de Ras), N-Ras (15%) et H-Ras (1%) [60].

Ras recrute à la membrane et phosphoryle les MAP3K « Raf » qui sont au nombre de 3 : A-Raf, B-Raf et C-Raf. Ce sont des sérine-thréonine kinases dont l'activation est dépendante de l'homo- ou l'hétérodimérisation des membres de cette famille.

Raf active ensuite les protéines Mek1 et Mek2 (*MAPK/Extracellular signal kinase Kinase*), s'associant également en homo- ou hétérodimères. Ce sont des MAP2K, capables d'activer les protéines Erk (qui sont des MAPK) [61].

Erk est la protéine effectrice possédant le plus large spectre de substrats (au moins 180) et pouvant notamment activer un large panel de facteurs de transcription (tels NF- κ B, AP-1). Ce pivot moléculaire est ainsi capable de promouvoir l'ensemble des fonctions cellulaires fondamentales : notamment la survie, la prolifération, la différenciation, le métabolisme, la sécrétion ... Erk est par ailleurs capable de s'autoréguler par une boucle négative, en phosphorylant des composants de sa voie de signalisation tels Sos, B-Raf (sur le résidu T753, ce qui réduit sa capacité de dimérisation), C-Raf (sur 5 résidus diminuant son activation), et Mek1 (sur 6 résidus diminuant l'activité de la protéine, et le résidu T292 qui diminue sa dimérisation avec Mek2) [62].

Bien que la voie Ras ait été montrée comme hyperactivée dans l'HCL [63], le ciblage thérapeutique de Ras (par les inhibiteurs de farnésyl-transférases notamment) n'a pas été étudié dans cette pathologie. Celui de ses effecteurs l'a été de manière plus complète et semble être une option intéressante dans l'HCL.

a. Les mutations de BRAF

Une avancée majeure de ces dernières années dans la compréhension de la physiopathologie de l'HCL a été la découverte de la mutation *BRAF* V600E (située dans l'exon 15 du gène *BRAF*) chez une large majorité des patients [15]. Le gène *BRAF* est généralement peu muté dans les leucémies, et l'absence de cette mutation dans d'autres lymphomes et leucémies lymphoïdes B a été confirmée dans cette étude. Cette substitution d'une valine par un acide glutamique dans la protéine B-Raf rend son activité kinase constitutivement active, en modifiant la structure tertiaire de la protéine (perte d'inactivation par une boucle riche en glycine) et en empêchant l'interaction avec la protéine inhibitrice Sprouty2 [64], [65]. Dans la famille Raf, B-Raf est le membre possédant la plus forte affinité avec Ras et la meilleure efficacité à phosphoryler Mek, son effecteur direct [66], [67].

Cette mutation a déjà été associée à la cancérogénèse, et est retrouvée dans environ 50% des mélanomes métastatiques, 45% des carcinomes papillaires thyroïdiens, 35% des carcinomes micropapillaires séreux de l'ovaire et 55% des cancers colorectaux [68]. Elle a été très étudiée dans le mélanome, où elle induit une activation de Mek et Erk, aboutissant notamment à la surexpression de la voie des cyclines [69], à la diminution de la phosphorylation de LKB1, inhibant l'activation de l'AMPK (*AMP-activated protein Kinase*)

qui réprime la voie mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*). Ce mécanisme induit la synthèse protéique en condition de stress métabolique et favorise ainsi la progression tumorale [70]. B-Raf modifie également la signalisation des intégrines et les propriétés invasives des cellules de mélanome (réduction de l'expression d'ICAM-1) [71].

La mutation V600E est associée à une augmentation de la survie et de la prolifération des cellules HCL. L'inhibition de ce mutant par le vemurafénib a montré *ex vivo* une diminution de l'activation de la voie MAPK, de l'expression de la cycline D1, de la présence de villosités à la surface des cellules ainsi qu'une augmentation de l'apoptose [72].

Notons que chez les patients ne portant pas la mutation V600E, des mutations alternatives ont été trouvées dans l'exon 11. Il s'agit de la mutation F468C, se situant également dans la boucle riche en glycine nécessaire à l'inactivation de l'activité kinase de B-Raf, et de la mutation D449E, qui pourrait modifier la conformation de la protéine et stabiliser la forme active. La présence d'une mutation alternative (S602T) a été détectée dans l'exon 15, sans que son impact sur d'éventuelles résistances aux inhibiteurs de B-Raf V600E n'ait été déterminé [20].

Ces données fonctionnelles confirment les observations empiriques cliniques faites lors de l'utilisation des inhibiteurs de B-Raf et prouvent l'intérêt du ciblage de cette protéine dans la leucémie à tricholeucocytes. Les efforts en vue du développement de nouvelles molécules thérapeutiques se concentrent sur cette protéine. Ainsi, la Simalikalactone E, un composé polycyclique extrait de *Quassia Amara* et initialement utilisé dans le traitement de la malaria, a montré une forte inhibition *in vitro* de B-raf et de la voie Mek/Erk sur des cellules leucémiques de patients HCL, plus puissante que celle du vemurafenib (efficacité à des doses de l'ordre du nanomolaire pour la Simalikalactone et du micromolaire pour le vemurafenib) [73].

b. L'axe Mek-Erk

Tiacci *et al* ont montré par immunohistochimie une hyperactivation de Erk dans une large cohorte de patients HCL [74]. Ces kinases sont suractivées, d'une part à cause de la mutation activatrice du gène *BRAF* (cf. paragraphe précédent) mais également par l'intermédiaire d'une voie annexe où la PKC (protéine kinase C) et la protéine Src maintiennent un niveau élevé de Erk phosphorylé. Cette activation de Erk favorise la survie des tricholeucocytes, et est abolie par l'inhibition pharmacologique de Mek1/2 et de la PKC. Il est à noter que les voies p38 et JNK sont également activées dans les tricholeucocytes, mais que leur activation a un effet pro-apoptotique. La survie des cellules est donc dépendante de la

balance entre ces voies, bien que l'inhibition seule de voies p38 et JNK ne soit pas suffisante pour améliorer la survie des cellules HCL [75] (cf. **Figure 5**, p. 18).

Des mutations activatrices du gène *MAP2K1* (codant Mek1) ont également été détectées dans 50% des HCLv et IGVH4-34 positifs (cf. plus loin p. 23) [76]. Ces mutations sont principalement situées dans une zone de 15 AA localisée dans la région d'autorégulation négative de la protéine, et d'autres moins nombreuses sont localisées dans le domaine catalytique. Une étude récente comportant 3 patients HCL « classiques » n'a révélé aucune mutation de *MAP2K1* [77]. Cependant, une étude à plus grande échelle serait nécessaire afin de déterminer la prévalence réelle des mutations de ce gène dans la forme classique de l'HCL.

L'utilisation d'inhibiteurs de ces kinases, tel le trametinib, s'est montrée efficace *ex vivo* sur des cellules de patients HCL, en favorisant leur apoptose et la diminution des villosités [72]. Le trametinib est un inhibiteur allostéristique non compétitif de la poche à ATP de la kinase, empêchant la phosphorylation activatrice de Mek1/2 sur la sérine 217 par B-Raf [78]. Il est à noter que son utilisation en combinaison du dabrafenib (inhibiteur de B-Raf V600E) annihile l'effet protecteur du microenvironnement tumoral sur les cellules leucémiques HCL traitées uniquement au dabrafenib, comme le montrent des expériences de co-cultures avec des cellules stromales [72]. Ceci suggère que le microenvironnement pourrait permettre de contourner l'inhibition de B-Raf, en activant la phosphorylation de Mek et Erk par une voie alternative.

Par son rôle de protéine effectrice directe de B-Raf et à cause des altérations de son gène, Mek semble un candidat intéressant dans le développement de nouvelles thérapies ciblées dans l'HCL. Son inhibition est efficace et nécessiterait une évaluation clinique. L'inhibition de Erk est également envisageable mais a longtemps été considérée comme peu intéressante dans l'optique où Erk étant l'effecteur connu de Mek, son inhibition n'aurait apporté aucun bénéfice thérapeutique supplémentaire. Cependant, la complexité des boucles de rétrocontrôle sur la voie Ras-Raf-Mek-Erk et l'émergence de résistance aux inhibiteurs de Raf et Mek ont remis la lumière sur l'utilité de cibler directement Erk. Le SCH772984, un inhibiteur de la poche d'ATP ciblant spécifiquement Erk1/2, a montré une efficacité *in vitro* et *in vivo* sur des cellules de mélanome résistantes à la fois aux inhibiteurs de B-Raf et de Mek et entre actuellement en essais cliniques de phase I [79].

La description d'un patient HCL négatif pour les mutations de BRAF mais présentant une hyperactivation de Erk renforce l'intérêt de développer des stratégies thérapeutiques alternatives au ciblage de la pierre angulaire qu'est B-Raf [20].

2. La voie du BCR

a. Rôle du BCR

Les lymphocytes B sont des acteurs importants de l'immunité acquise. Ce sont des cellules capables de répondre rapidement aux stimuli de leur environnement, afin de pouvoir provoquer une réponse humorale efficace. Le BCR (*B-Cell Receptor*) joue un rôle clef dans l'ensemble des mécanismes complexes régissant cette réponse. Il est ainsi capable de jouer sur la différenciation des cellules B naïves, ainsi que sur leur prolifération et leur survie nécessaires à la sélection et à l'expansion clonale, aboutissant à des lymphocytes B matures fonctionnels et à l'élimination des cellules B autoimmunes. Ces cellules différenciées expriment différents répertoires de BCR, afin de pouvoir répondre de manière spécifique à l'antigène, et provoquer la sécrétion d'immunoglobulines. Cette diversité de répertoires résulte de la recombinaison des gènes V, D et J pour les chaînes lourdes (IgH) et des gènes V et J pour les chaînes légères (IgL) dans la moelle osseuse et de l'hypermutation somatique des gènes des immunoglobulines ayant lieu durant la sélection clonale des lymphocytes B dans le centre germinatif [80], [81].

L'activation chronique du BCR pourrait fournir aux tricholeucocytes des signaux de survie et de prolifération favorisant la progression tumorale, paradigme ayant déjà été proposé dans la LLC comme à l'origine du développement de la maladie [81]. De plus, le microenvironnement médullaire est propice à la présence d'auto-antigènes et d'antigènes microbiens (virus latents, bactéries commensales), stimulant le BCR et donc l'expansion des cellules leucémiques [42].

b. La signalisation du BCR

Le BCR est une immunoglobuline transmembranaire (mIg) associée aux sous-unités hétérodimériques des molécules de signalisation CD79 α (Ig α) et CD79 β (Ig β). La spécificité pour l'antigène du complexe est déterminée par le statut mutationnel des régions variables des chaînes légères (IgL) et lourdes (IgH) de la mIg. Suite à l'activation du BCR par un antigène, la tyrosine kinase cytosolique Lyn est recrutée à la membrane et phosphoryle des résidus de tyrosines sur les motifs ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) des Ig α et β . Ces motifs ITAMS activés servent de point d'amarrage à la protéine Syk, induisant son changement de conformation. Cette association forme un signalosome permettant d'activer 3 voies de signalisation. La première est la voie Btk (protéine de la famille Tec)-PLC γ 2, formant du DAG (di-acyl-glycérol) et de l'IP $_3$ (inositol-3-phosphate). Le DAG active ensuite

la PKC et par conséquent la voie NF- κ B. L'IP₃ quant à lui induit la voie calcique et le facteur de transcription NFAT. La seconde signalisation est celle de PI3K/Akt, activant la sérine/thréonine kinase mTOR. La dernière est la voie Ras/Raf/Mek/Erk. Dans le contexte de l'HCL, où cette dernière voie est déjà hyperactivée et impliquée dans la progression tumorale, il est particulièrement intéressant de noter que l'engagement du BCR peut exacerber sa stimulation. (cf. **Figure 5**, p 18).

L'activation de ces nombreuses voies par le BCR est associée à la prolifération, à la survie et à la sécrétion de cytokines par les lymphocytes B normaux [80], [82].

c. Altérations de la voie du BCR et ciblage de sa signalisation dans l'HCL

Les régions VDJ du BCR sont mutées dans la majorité des cas chez les patients atteints d'HCL, avec une faible variation intraclonale, ce qui suggère qu'un type particulier d'antigène pourrait influencer l'évolution de la maladie. Ainsi, les répertoires IGHV3-21, IGHV3-30 et IGHV3-33 sont retrouvés pour les IgH et IGLJ3 exclusivement pour les IgL. Le ratio κ/λ est inversé (0,7 / 1). Cependant, des cas de tricholeucocytose avec un statut non muté des gènes *IGHV* ont été détectés de manière minoritaire, et sont associés à un plus mauvais pronostic (comme ceci a été montré dans la LLC) et à des résistances aux analogues de purines [83]. De plus, un statut IGHV4-34 rare a été associé à une forte présence des cellules leucémiques dans le sang, un taux de réponse aux traitements plus faible ainsi qu'un taux de récurrence plus élevé [35]. Le BCR semble donc un élément important dans la progression de cette leucémie, et potentiellement une cible intéressante dans le développement de nouveaux traitements.

Cependant, l'état des connaissances sur la signalisation du BCR dans la tricholeucocytose est encore assez lacunaire. Sivina *et al* ont montré une activation de Btk, Akt et Erk dans des cellules de patients HCL. L'ibrutinib (PCI-32765) est un inhibiteur de l'activité kinase de Btk se liant sur sa cystéine 481. Cette inhibition a conduit à une diminution de l'activation de la voie de signalisation du BCR ainsi que de la survie et de la prolifération des cellules HCL. La sécrétion du CCL3 et CCL4 suite à l'engagement du BCR est également inhibée [84]. L'ibrutinib est actuellement utilisé comme traitement de seconde ligne dans la LLC [85], ouvrant la voie à une indication supplémentaire dans le traitement des HCL réfractaires.

La présence de flux calciques anormalement élevés a également été détectée dans l'HCL. Ils y sont plus forts dans les cellules de patients HCL que dans les lymphocytes B

circulants ou activés, ou que dans les cellules issues de patients atteints de LLC ou de lignées B lymphoïdes. Le traitement des cellules par l'IFN- α ramène les flux calciques à la normale, suggérant que ce phénomène est lié à la survie cellulaire [86]. Cette observation est intéressante, dans le sens où des flux calciques augmentés favorisent la survie et la prolifération cellulaire [87], l'activation de la voie Btk/PLC γ 2/IP $_3$ étant liée à la libération de calcium. L'inhibition de la signalisation du BCR pourrait donc diminuer la survie cellulaire.

Ces données semblent indiquer que le ciblage moléculaire des protéines activées par la stimulation du BCR constitue une option thérapeutique intéressante dans l'HCL afin d'atténuer les signaux de survie et de prolifération des cellules leucémiques, mais également de limiter leur interaction avec le microenvironnement, ou de diminuer l'activation de l'axe Ras-Erk. Outre Btk, le blocage des autres effecteurs de cette voie du BCR mériterait d'être étudié dans l'HCL. Ainsi, les inhibiteurs de Syk, tel le fostamatinib (R788), ont montré une forte activité antileucémique dans la LLC, en diminuant la survie des cellules induite par le BCR ainsi que leur migration et la sécrétion de cytokines [88]. Le R788 est actuellement en cours d'essai clinique. De même, les inhibiteurs de PI3K δ peuvent être envisagés, l'isoforme δ étant la plus exprimée dans les cellules hématopoïétiques. L'idelalisib (CAL-101), premier inhibiteur sélectif, a passé les essais cliniques de phase I dans le traitement de la LLC et des lymphomes B non Hodgkiniens réfractaires [85], [89]. Cette molécule est capable d'inhiber la voie PI3K-Akt-mTOR pour induire la mort des cellules et peut aussi atténuer les signaux du microenvironnement [90], [91].

L'étude des voies MAPK et du BCR a permis de mettre en lumière de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques dans l'HCL, dont certaines ont déjà abouti à la conception de molécules efficaces contre les tricholeucocytes (vemurafenib, trametinib, ibrutinib). D'autres voies de signalisation sont également au stade d'études plus fondamentales dans cette leucémie.

3. Les Rho-GTPases

a. Caractéristiques et classification

Les Rho-GTPases font partie de la superfamille des petites GTPases ou petites protéines G (30% d'homologie de séquence) et sont des effecteurs secondaires de diverses voies de signalisation. Elles ont pour la plupart un faible poids moléculaire (190-250 acides aminés) et ont une structure commune, formée d'une petite insertion Rho importante dans l'activation des effecteurs secondaires ainsi que de deux extensions à leurs extrémités C-terminale et N-terminale. Ces protéines sont capables de passer d'une forme inactive liée au GDP à une forme active liée au GTP, modifiant la conformation des régions Switch I et II et permettant l'interaction avec leur effecteurs (cf. **Figure 6**). Agissant sur de nombreux phénomènes physiologiques, ces GTPases nécessitent un contrôle rapide de leur activité, notamment grâce aux protéines GAP (*GTPase Activating Proteins*), GEF (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*) et GDI (*GDP Dissociation Inhibitors*) qui régulent la balance entre les formes active et inactive (cf. **Figure 7**) [92]. Les Rho-GTPases possèdent un domaine de type CAAX pouvant être isoprénylé (par un motif géranyl-géranyl le plus souvent, ou farnésyl). Cette modification post-traductionnelle conduisant à leur recrutement à la membrane est nécessaire à l'interaction avec leurs effecteurs.

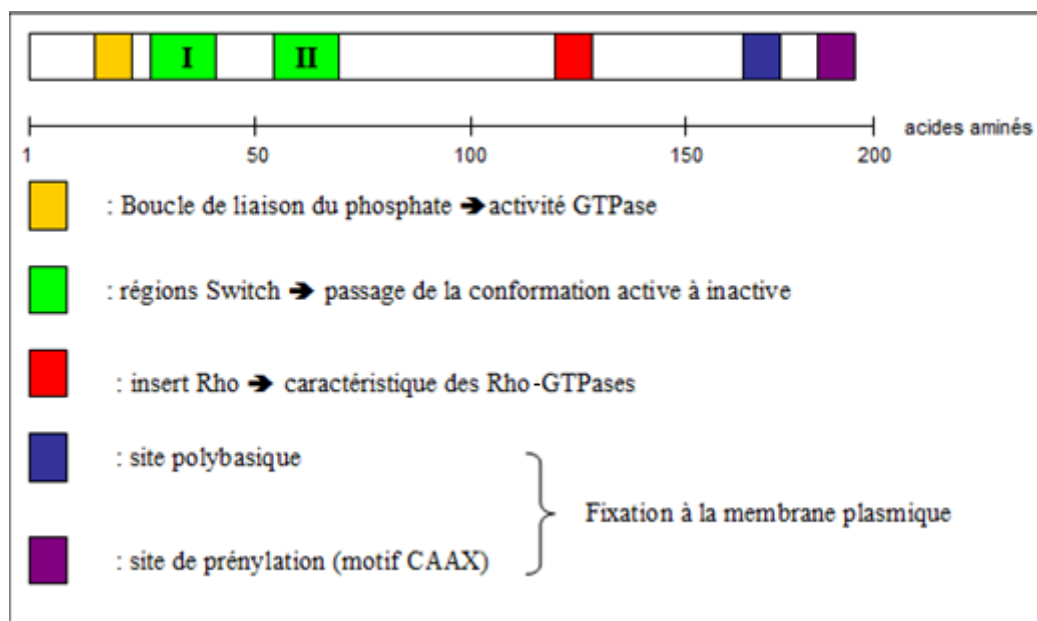


Figure 6 : Représentation schématique de la structure des Rho-GTPases. Remarque : Cette représentation prend en compte toutes les régions décrites dans la famille des Rho-GTPases, mais toutes les Rho-GTPases ne possèdent pas l'ensemble des régions décrites ici, telles les RhoBTB et Miro qui n'ont pas de motif de prénylation.

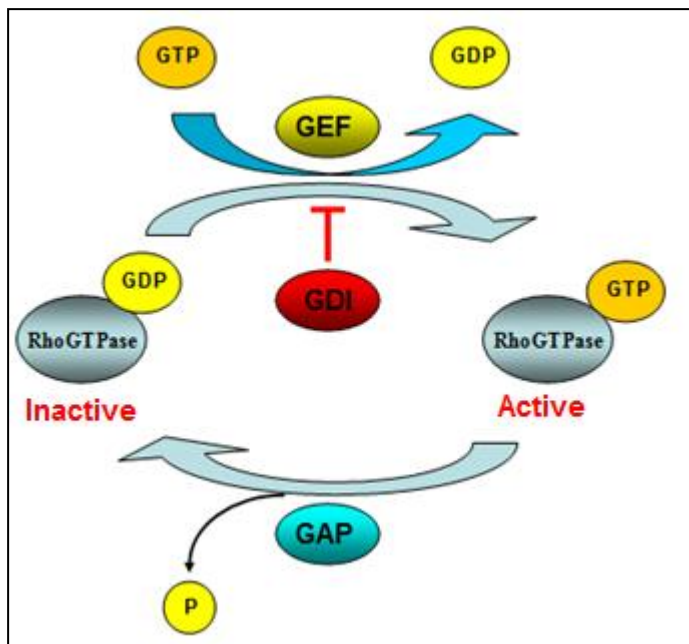


Figure 7 : Régulation des Rho-GTPases dépendante du GTP. Les GEF favorisent la fixation du GTP et l'activation des Rho-GTPases. Les GDI, en inhibant la dissociation du GDP, maintiennent la protéine sous forme inactive. Les GAP augmentent l'activité GTPasique de la protéine, déplaçant l'équilibre réactionnel vers la forme inactive. D'après Mulloy et al⁹².

Cette famille rassemble vingt-deux gènes codant au moins vingt-trois protéines connues à ce jour. Selon une classification récente, elles sont regroupées en huit sous-familles réparties en 4 groupes selon leur proximité phylogénétique et leurs similitudes : le groupe I comprend (1) la sous-famille RhoA (comportant également RhoB et RhoC), (2) la sous-famille Rnd (Rnd1, Rnd2 et RhoE/Rnd3), principalement caractérisée par une faible activité GTPasique et (3) la sous-famille de RhoD et RhoF (Rif). Le second groupe comporte (4) la sous-famille Rac (avec Rac1 et son variant d'épissage Rac1b, Rac2, Rac3 et RhoG) ; (5) la sous-famille Cdc42, comprenant le variant d'épissage de Cdc42 : G25K, RhoQ (TC10) et RhoJ (TCL) ; (6) la sous-famille RhoU (Wrch) et RhoV (Chp). Le troisième groupe est uniquement formé de (7) RhoH (TTF) et le quatrième groupe de (8) la sous-famille RhoBTB (RhoBTB1, RhoBTB2). RhoBTB3 ainsi que la sous-famille Miro, récemment décrite (Miro-1, Miro-2), tout d'abord classées comme faisant partie des Rho-GTPases, sont ici considérées comme deux catégories distinctes parmi les Ras-GTPases [93], [94] (cf. **Figure 8**).

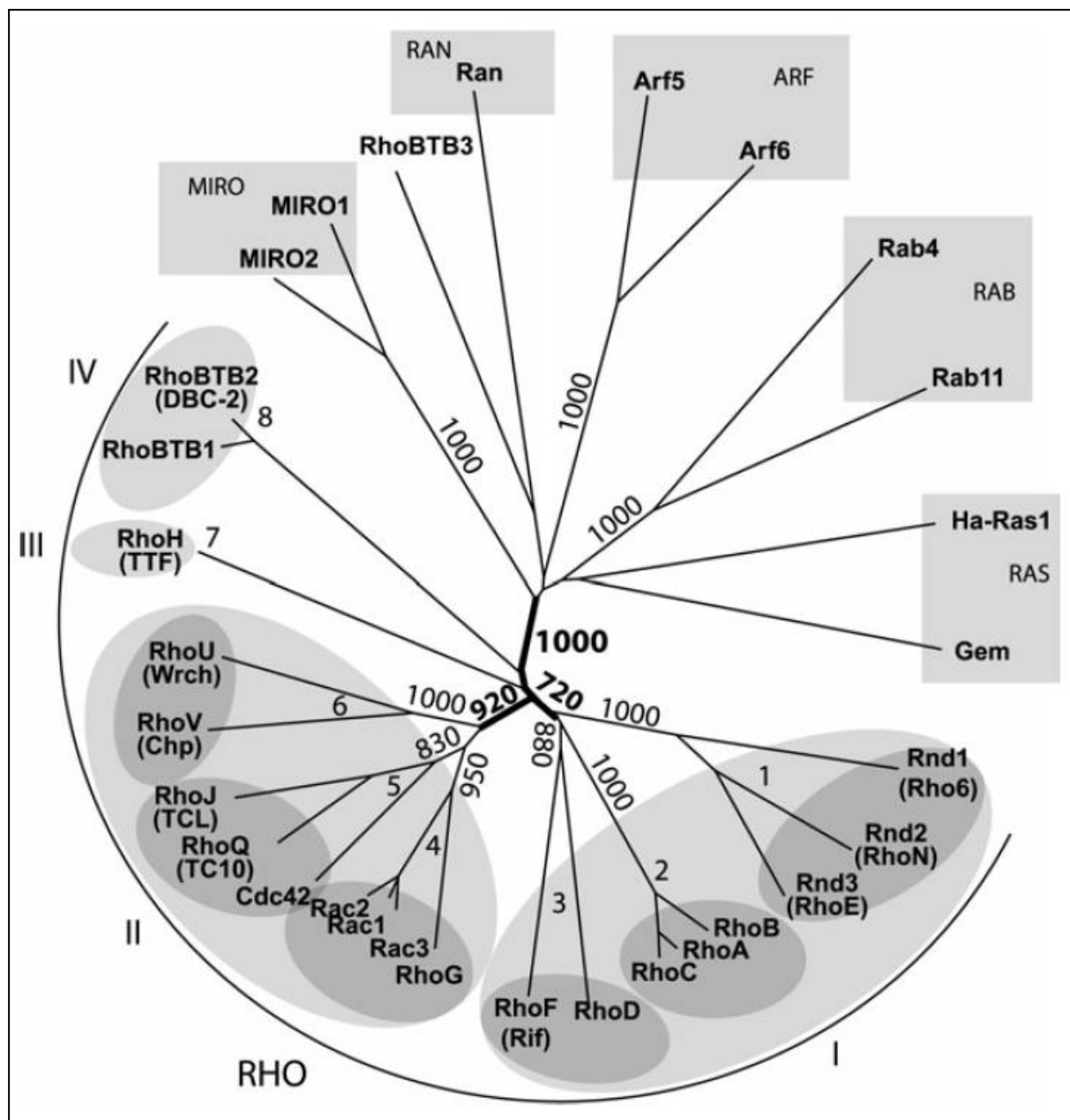


Figure 8 : Arbre phylogénétique présentant les sous-familles de Rho-GTPases parmi d'autres petites protéines G. Tiré de Boureux *et al* [94].

b. Fonctions physiologiques des Rho-GTPases dans les cellules hématopoïétiques

Ces protéines agissent en tant qu'effecteurs essentiels dans la transduction des signaux intracellulaires, et sont impliquées dans de nombreux phénomènes physiologiques. Rac1 et Rac2, Cdc42 et RhoA figurent parmi les plus étudiées. Ce sont des facteurs de prolifération (modulant la phase G1 du cycle cellulaire via Erk), capables d'activer NF- κ B et de modifier la réorganisation du cytosquelette d'actine [95]–[97]. Plus particulièrement, ces Rho-GTPases sont essentielles au développement des cellules hématologiques. Ainsi, Rac2, qui est

spécifiquement exprimée par les lignées hématopoïétiques, et Rac1 participent à l'adhérence, la migration, la survie et la prolifération des précurseurs hématopoïétiques (via la voie Erk pour Rac1 et la voie Akt pour Rac2) et des neutrophiles [98]. A l'inverse, l'activité de Cdc42 est liée à l'apoptose des cellules souches hématopoïétiques (via l'activation de la voie JNK) ; des cellules Cdc42GAP^{-/-} montrent une distribution focale et anormale de l'actine, conduisant à un déficit d'adhérence et de migration [99]. Ce recouplement des rôles entre Rho-GTPases, telles Rac2 et Cdc42 dans l'adhérence et la migration des cellules souches hématopoïétiques, suggère une régulation fine de ces protéines et des gènes qui les codent afin de garantir le développement ordonné de ces cellules, régulation pouvant être transcriptionnelle ou dépendante de la localisation subcellulaire [92].

Dans les lymphocytes B, Rac1 et Rac2 ne semblent pas nécessaires au développement des précurseurs, mais sont cruciales pour leur différenciation et pour la prolifération et la survie des lymphocytes B matures. Elles agissent comme effecteurs du BCR par la voie PI3K/Akt et diminuent l'expression du récepteur de la cytokine BAFF et du facteur anti-apoptotique Bcl-xL [100]. Il en va de même pour Cdc42, importante pour la différenciation des lymphocytes B matures, qui module les signaux du BCR (suractivation d'Akt mais inhibition de Erk) mais n'agit pas sur la migration de ces cellules [101].

L'importance des Rho-GTPases dans la physiologie des cellules sanguines explique que la dérégulation de leur expression soit impliquée dans de nombreuses hémopathies, telles l'anémie de Fanconi, le syndrome de Wiskott-Aldrich, les leucémies myéloïdes chroniques et aiguës, la LLC, les lymphomes non Hodgkiniens et le myélome multiple [92].

c. Dérégulation des Rho-GTPases dans l'HCL

L'aspect chevelu des tricholeucocytes, caractéristique de la maladie, provient de la formation de pics d'actine (filopodes) et de lamellipodes à la surface des cellules. Ces structures cellulaires sont impliquées dans les phénomènes d'adhérence et de migration, particulièrement perturbés dans l'HCL [102]. L'éventuelle perturbation de l'organisation du cytosquelette dans cette pathologie semble dès lors cruciale. Les tricholeucocytes présentent d'ailleurs une surexpression de Lsp1, protéine se liant à l'actine et régulant sa polymérisation [103].

Les Rho-GTPases étant importantes dans la régulation du cytosquelette régissant la forme et la migration cellulaires, l'hypothèse d'un rôle essentiel de ces protéines dans la morphologie si spécifique des cellules HCL et dans leurs propriétés adhésives a été formulée. Zhang *et al* ont montré une surexpression et une activation constitutive de RhoA, Rac1 et

Cdc42 dans les tricholeucocytes, à la différence des cellules de LLC. Cette suractivation a été associée à une augmentation de la croissance cellulaire et à la formation des structures d'actine aberrantes. Si les trois Rho-GTPases « classiques » (RhoA, Rac1 et Cdc42) semblent augmenter la présence des protrusions d'actine, seul le dominant négatif de Rac1 annihile totalement la formation des lamellipodes, contrairement à ceux de RhoA et Cdc42 [104]. Chaigne-Delalande *et al* ont ensuite confirmé la suractivation de Rac1 et Cdc42 et leurs effets sur la modification du cytosquelette dans l'HCL, ceci n'étant pas vérifié pour RhoA. Cette différence pourrait provenir de l'origine des lignées cellulaires, celle de Zhang *et al* pouvant être un HCL_{jv} (le variant japonais de l'HCL), tandis que celles étudiées par l'équipe française seraient dérivées d'HCL classique. Ces observations sont intéressantes et expliqueraient d'ailleurs l'activité anti-leucémique de l'IFN- α , par la répression de Rac1 et Cdc42 et une surexpression de RhoA, qui serait plus en rapport avec un effet anti-tumorigène de RhoA précédemment décrit dans ce type cellulaire [105].

D'autre part, la capacité des Rho-GTPases à interférer avec la voie Ras-Raf-Mek-Erk est particulièrement intéressante dans le contexte des mutations de *BRAF* et de l'efficacité thérapeutique de l'inhibition de cette voie dans l'HCL. En effet, dans les lymphocytes B, Cdc42 antagonise l'activation du BCR et réduit la phosphorylation de Erk [101]. De plus, il a été montré que Rac1 favorisait l'activation de Erk, en activant Pak1, dans des kératinocytes [106]. Le rôle de ces Rho-protéines dans la signalisation du BCR constitue donc un autre levier pour moduler les signaux de cette voie dans un but thérapeutique. Ainsi, Rac1, Rac2 et Cdc42 promeuvent la phosphorylation d'Akt lors de l'activation du BCR [100], [101].

Des molécules mimétiques ou antagonistes de l'action de ces petites GTPases peuvent alors être envisagées pour compléter l'arsenal thérapeutique dans le traitement de l'HCL réfractaire. Il reste cependant beaucoup à découvrir dans ce domaine, notamment le mécanisme d'action précis de ces protéines sur les voies de survie et de prolifération cellulaire, ou encore leur domaine d'interaction avec les acteurs des voies MAPK et PI3K/Akt dans l'HCL. Des inhibiteurs spécifiques des Rho-GTPases existent, tel le NSC-23766 pour Rac1 ou le ML141 pour Cdc42, mais leur efficacité dans le domaine de l'oncologie n'a pour l'heure été démontrée qu'en phase préclinique [107], [108].

Nous venons de dresser un panorama des voies de signalisation pouvant ouvrir à de nouveaux champs thérapeutiques dans le traitement de l'HCL réfractaire. Bien que les

inhibiteurs de la forme mutée de B-Raf et les inhibiteurs directs de la voie Ras-Raf-Mek-Erk montrent une activité intéressante, des résistances à ces traitements ou des efficacités seulement partielles ont déjà été décelées [57]. L'inhibition d'autres voies de signalisation (telles celles des Rho-GTPases ou du BCR) permettrait de cibler indirectement cette voie majeure de la pathologie HCL pour outrepasser ces résistances, ou même représente à elle seule un intérêt thérapeutique dans la maladie (effet sur la voie PI3K/Akt). Ces voies de signalisation dérégulées dans l'HCL, ainsi que les thérapeutiques envisageables les ciblant, sont rappelées ci-dessous (**Figure 5**) :

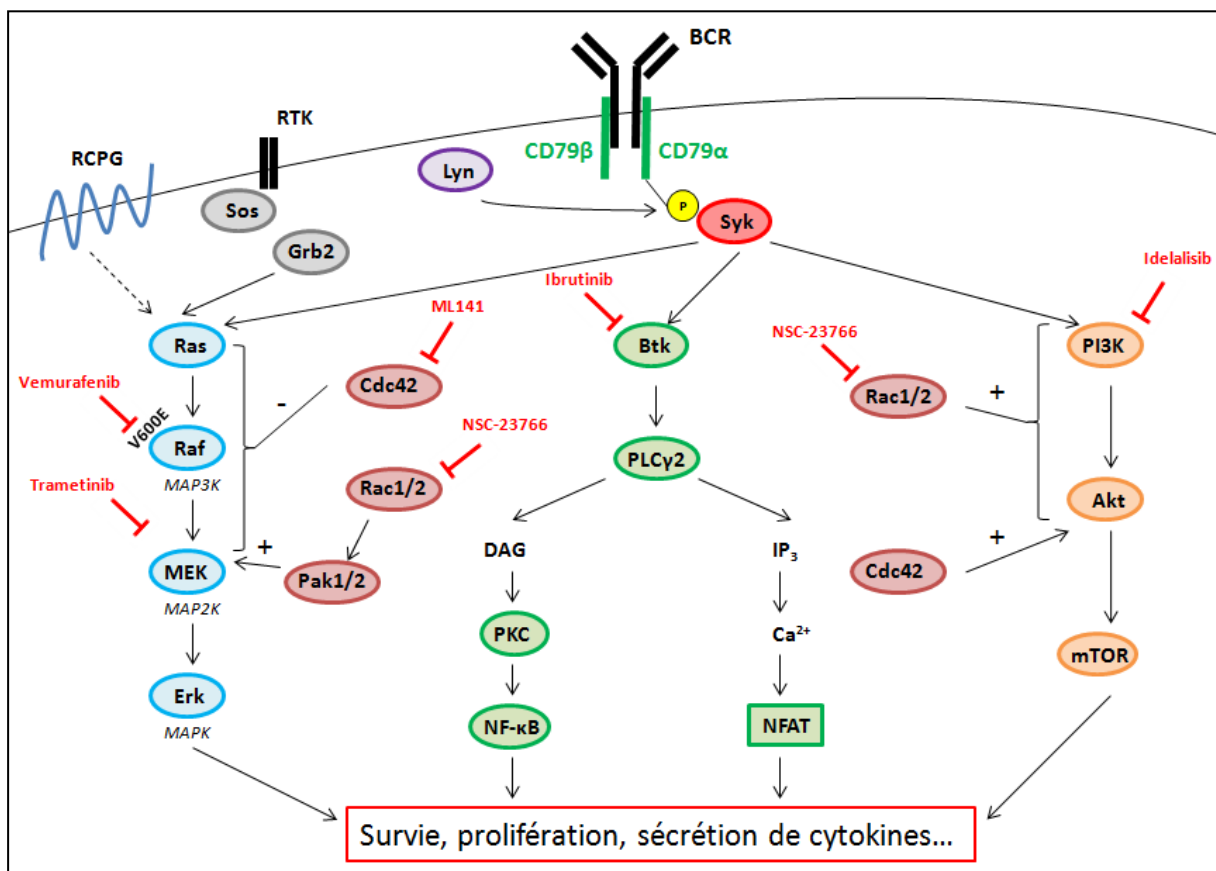


Figure 5 (rappel) : Les voies de signalisation dérégulées dans l'HCL et les potentielles nouvelles cibles thérapeutiques. Les flèches montrant l'inhibition d'une protéine et le nom de l'inhibiteur correspondant sont indiqués en rouge. Les symboles « + » et « - » indiquent des effets activateurs ou inhibiteurs d'une voie sur une autre. RCPG : récepteur couplé aux protéines G / RTK : récepteur à tyrosine kinase / MEK : MAPK/Erk Kinase / Erk : Extracellular signal-Regulated Kinase / Btk : Bruton's Tyrosine Kinase / PLC : PhosphoLipase C / DAG : DiAcylGlycérol / PKC : Protein Kinase C / IP₃ : Inositol 3-Phosphate / NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells / PI3K : Phosphatidyl inositol-3 Kinase / mTOR : mammalian Target of Rapamycin.

Les travaux précédemment menés dans notre laboratoire avaient permis il y a vingt ans la découverte d'un gène codant une nouvelle Rho-GTPase : la protéine RhoH [109]. L'équipe du Dr Galiègue-Zouitina a identifié et poursuivi l'étude de cette protéine, à la régulation complexe et présentant des caractéristiques singulières par rapport aux autres membres de la famille Rho, et a démontré sa sous-expression dans la tricholeucocytose [110]. Cette équipe a par ailleurs montré un effet onco-protecteur de RhoH dans l'HCL, dont la ré-expression dans une lignée cellulaire HCL, JOK-1, a conduit à une diminution de la prolifération, de l'adhérence homo- et hétérotypique, de la migration transendothéliale *in vitro* ainsi que du développement de tumeurs induites *in vivo* chez la souris NOD/SCID. La surexpression de RhoH dans ce modèle est également associée à une répression de l'activité du promoteur et de l'expression du gène *CD11c*, codant pour une intégrine $\beta 2$ importante dans le diagnostic et surexprimée dans l'HCL [110].

4. La protéine RhoH

a. Une Rho-GTPase atypique

Le gène codant RhoH a été donc découvert en 1995, fusionné au gène *LAZ3/BCL6* dans une translocation entre les chromosomes 3 et 4, dans les lymphomes B non Hodgkiniens. Ceci est à l'origine de la première dénomination de RhoH : *TTF*, pour *Translocation Three Four* [109].

RhoH est une petite protéine G (191 acides aminés) qui possède la particularité de n'être exprimée que dans les lignées cellulaires hématopoïétiques (comme Rac2), avec une expression très marquée dans les lignées lymphoïdes [111], [112].

Le gène *RHOH* est localisé en position p13 du chromosome 4 dans le génome humain [113]. Il possède un seul exon codant (exon 7) contenant le cadre de lecture ouvert et présente une grande complexité dans sa région 5' génomique. Celle-ci comporte aux moins six exons non codants (1 à 6) et trois sites d'initiation de la transcription, le site majeur étant situé en amont de l'exon 4 (cf. **Figure 9**), générant de nombreux transcrits exprimés différemment selon le type cellulaire étudié (ex : les lymphocytes T n'expriment que l'isoforme « 4-6-7 » tandis que les lymphocytes B expriment trois isoformes) [112]. Cette diversité et spécificité des transcrits suggèrent une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de *RHOH* complexe et différente selon le type tissulaire.

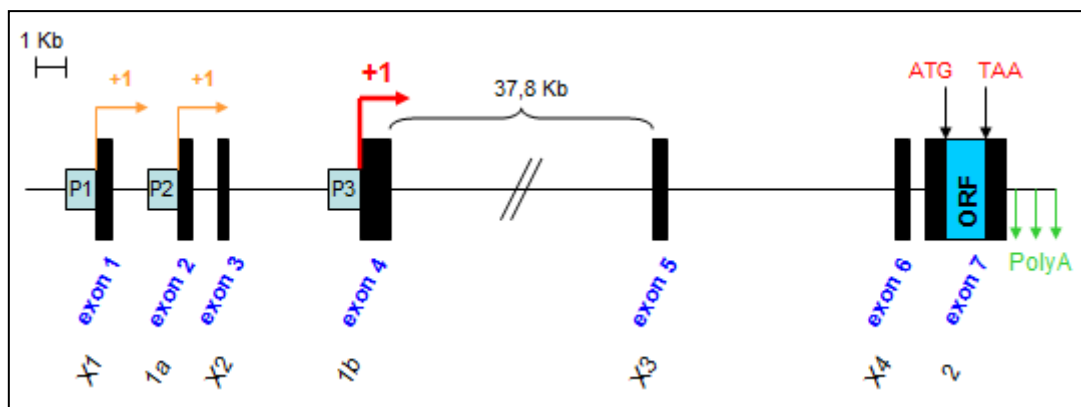


Figure 9 : Structure du gène *RHOH*. Exons 1 à 6 : exons non codants ; *ORF* (Open Reading Frame) : cadre ouvert de lecture du gène *RHOH* ; *P1*, *P2*, *P3* : promoteurs du gène *RHOH* ; **+1** : site majeur d'initiation de la transcription ; **+1** : sites mineurs d'initiation de la transcription ; **PolyA** : sites potentiels de polyadénylation ; *en noir* : ancienne nomenclature [112]; *bleu* : nouvelle nomenclature [114].

RhoH partage des caractéristiques structurales communes avec les autres membres de la famille Rho, tels une séquence CKIF de prénylation et un site polybasique nécessaire à son ancrage membranaire. Cependant, une autre particularité de RhoH réside dans sa structure. En effet, elle peut également être phosphorylée sur une région de type ITAM dont la séquence correspond au motif consensus $Y_{xx}A(X)_6Y_{xx}A$ (Y : tyrosine, A : alanine, X : résidu quelconque) [115]. De plus, elle possède un insert Rho tronqué (7 acides aminés au lieu de 12) et une absence d'activité GTPasique intrinsèque (comme les protéines de la famille Rnd) due à une substitution de la Gly12 (dans la protéine Ras) en Ser13 pour RhoH dans la boucle de fixation du phosphate et de la Gln61 (dans Ras) en Asp62 (dans RhoH) dans le domaine Switch II [109]. Elle est donc présente sous forme constitutivement active, ceci lui conférant des propriétés antagonistes des autres Rho-GTPases [111]. La régulation de son activité est donc régie par d'autres mécanismes, comme la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle, le recrutement à la membrane par le motif de prénylation CKIF ou la phosphorylation du motif ITAM-like nécessaire à la fixation à d'autres protéines [116].

b. Un rôle ambivalent

La liaison constitutive de RhoH avec le GTP a été suggérée comme créant un antagonisme fonctionnel potentiel entre RhoH et d'autres GTPases. Ainsi, RhoH diminue l'activation des voies p38 et NF- κ B par régulation négative de Rac1, RhoA et Cdc42 dans la lignée cellulaire Jurkat [111]. De plus, dans les précurseurs hématopoïétiques, cette inhibition de Rac par RhoH induit l'inhibition de la prolifération, de la survie et de la migration, suite à leur stimulation par le SCF [117]. L'association à la membrane de Rac1, nécessaire à son

activité, est également inhibée par RhoH, modifiant l'organisation de l'actine et donc le chimiotactisme des précurseurs hématopoïétiques en réponse au SDF1 α [118]. Cette compétition à la membrane cellulaire entre ces deux protéines fournit un second mécanisme d'antagonisme de RhoH envers Rac1. RhoH diminue également l'adhérence cellulaire due au LFA-1 dans le modèle T Jurkat [119].

Cependant, le rôle de RhoH ne se limite pas à une régulation négative des fonctions physiologiques des cellules hématologiques. Son rôle d'effecteur positif a été démontré par Gu *et al*, dans les premières étapes de la signalisation du TCR, par fixation sur ZAP70 grâce au motif ITAM, ceci entraînant l'induction du LAT signalosome, conduisant à la différenciation des cellules T [115], [120]. RhoH est également impliquée dans la migration des lymphocytes T induite par SDF1 α [121]. Récemment, son interaction avec Syk a été mise en évidence dans la voie de signalisation du BCR [122]. Toutefois, RhoH n'a pas été étudiée de manière plus exhaustive dans les lymphocytes B normaux.

c. Anomalies de RhoH dans les hémopathies malignes

Le rôle de modulateur de signaux cellulaires de RhoH, interagissant avec des protéines participant à des voies de transduction du signal importantes dans l'hématopoïèse, suggère que des aberrations de son expression pourraient être liées au développement d'hémopathies malignes.

Ainsi, un faible taux d'expression de RhoH serait associé à un mauvais pronostic dans la LAM [123]. Outre la répression de son expression dans l'HCL dont nous avons parlé précédemment, le gène *RHOH* est à l'inverse surexprimé dans la LLC avec une expression qui semble corrélée à celle de la protéine ZAP-70, marqueur de mauvais pronostic dans cette leucémie. Alors que la délétion de *RHOH* ne semble pas modifier significativement la lymphopoïèse normale chez la souris, elle diminue l'accumulation des cellules leucémiques dans le sang, la rate et la moelle dans un modèle murin de LLC [124]. RhoH semble donc associée à un mauvais pronostic dans cette leucémie.

Le gène *RHOH* est situé dans une zone d'instabilité génétique et les anomalies qu'il présente ont été détectées dans les hémopathies B lymphoïdes. Outre la translocation (3;4)(q27;p13) entre *RHOH* et *LAZ3/BCL6* dans les lymphomes non Hodgkiniens folliculaires aboutissant à la dérégulation de l'expression des 2 gènes par substitution de promoteurs [109], [125], une translocation (4;14)(p13;q32) a également été détectée dans un cas de myélome multiple [125]. Le gène *RHOH* est le lieu d'hypermutations somatiques (HMS) aberrantes, dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (46%) [126]. Cependant, ces HMS ne

semblent pas impacter le pronostic des patients [126]. Elles se situent dans la partie 5' du gène, région décrite pour favoriser les translocations [125], [127]. Elles ont également été détectées sur ce gène, à une fréquence moindre, dans d'autres lymphomes [128], [129]. Sachant que ces HMS ont principalement lieu dans des cellules du centre germinatif et que l'origine germinative ou post-germinative de l'HCL est controversée, une recherche de ces HMS sur le gène *RHOH* chez des patients HCL serait intéressante afin de peut-être mieux comprendre les mécanismes de répression de *RHOH* dans cette leucémie.

Par sa répression anormale et son rôle limitant la progression tumorale, RhoH semble une cible thérapeutique intéressante dans l'HCL. En effet, mimer son activité pourrait aboutir à une stratégie thérapeutique innovante, en essayant de reproduire l'interaction de RhoH avec ses effecteurs (tel Syk) ou en antagonisant l'activité de Rac1 et/ou de Cdc42, connues pour promouvoir le phénotype leucémique [104], [105]. De plus, la restriction de son expression aux cellules hématopoïétiques constitue un avantage permettant d'éviter la survenue d'effets secondaires liés à l'activité physiologique de la protéine. Cependant, le *design* de tels composés mimétiques s'avère ardu.

Afin de déterminer les cibles moléculaires de RhoH responsables de cette atténuation de la progression tumorale de l'HCL et pouvant potentiellement servir de cibles alternatives, notre équipe a réalisé une étude transcriptomique comparative entre la lignée cellulaire HCL JOK-1 surexprimant RhoH (JOK-RhoH ou JOK-R) et la même lignée cellulaire transfectée de manière stable avec le vecteur d'expression vide (JOK-Empty ou JOK-E). La modulation d'expression génique la plus importante observée s'est révélée être la répression du gène *CD38*, d'un facteur 7.

III. CD38 : bien plus qu'un marqueur de différenciation

Le choix de l'étude de la protéine CD38 ne se base pas uniquement sur sa régulation par RhoH dans notre modèle HCL. Elle possède des rôles physiologiques multiples et influence tout particulièrement le développement des lymphocytes B.

1. Le gène *CD38*

Le gène *CD38*, long de 70,6 kb, est situé en position 4p15 dans le génome humain, comporte 8 exons et 98% de séquences introniques. L'exon 1 code la partie 5'UTR de l'ARNm, les parties intracellulaire et transmembranaire de la protéine. Les exons 2 à 8 codent la partie extracellulaire porteuse du site catalytique de l'enzyme, des sites de glycosylation et des sites de fixation au hyaluronate [130]. La partie 5' génomique ne comporte pas de boîte TATA, ni de motif CCAT. Un site majeur d'initiation de la transcription a été décrit et plusieurs autres sites mineurs sont également présents [130]. La région 5' de l'ARNm comporte une séquence « *GC-rich* » située avant le codon initiateur de la traduction. Le gène *CD38* semble également dépourvu d'un signal de polyadénylation classique. D'un point de vue phylogénétique, le gène *CD38* possède une forte homologie avec celui codant pour une ADP-ribosyl-cyclase de l'ovotestis du mollusque marin *Aplysia Californica*. La séparation de l'exon 4 du gène de la cyclase du mollusque en 2 exons dans le gène *CD38* humain et la très forte homologie de séquence avec le gène murin *BST1* suggèrent une duplication du gène avant la divergence phylogénétique entre humains et rongeurs [131]. Le premier intron du gène *CD38* est très long (37 kb) et possède des éléments de régulation dans sa partie proximale, ce qui suggère un rôle actif de cet intron dans les phénomènes d'épissage alternatif de ce gène.

2. Régulation de l'expression du gène *CD38*

a. Régulation transcriptionnelle

La régulation de ce gène a été étudiée dans des modèles hématopoïétiques, ainsi que dans les cellules musculaires lisses des voies aériennes.

i. Dans les cellules musculaires lisses des voies aériennes

Dans ces cellules, il a été montré que le récepteur aux glucocorticoïdes et les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (via sa sous-unité c-Jun) régulent directement le gène *CD38*, par fixation sur des éléments *cis* présents dans la région 5' du gène. Ces sites de fixation ont été déterminés par des techniques d'EMSA (*ElectroMobility Shift Assay*) et de gène rapporteur (cf. **Figure 10**, p. 37) [132]. Le TNF- α augmente l'expression de *CD38* via ces facteurs, et la dexaméthasone abolit l'activation de NF- κ B en augmentant l'expression d'I κ B [133]. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques dans ces cellules a révélé que NF- κ B et AP-1 sont régulés par les voies p38 et JNK, ce qui a été confirmé par la transfection de dominants

négatifs [134].

ii. Dans les cellules myéloïdes

Un élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE : *Retinoic Acid Response Element*) a été étudié dans les cellules myéloïdes (lignée HL60). L'ATRA régule *CD38* par le récepteur nucléaire RAR- α [135]. Kishimoto *et al* ont déterminé la présence d'un élément RARE de type DR-5 (*Direct repeat*, 2 motifs de liaison hexamériques séparés par 5 nucléotides) au tout début de l'intron 1 du gène *CD38*, activé par le dimère RAR- α /RXR- α [136]. Cependant, il est à noter que deux mécanismes de régulation ont été décrits pour cet élément RARE : une phase précoce dépendante de RAR- α et une phase retardée passant par PKC δ qui active Creb. L'ATRA induit les 2 événements, alors que le tamibarotène (Am80, agoniste synthétique de RAR utilisé dans le traitement de la LAM3) induit uniquement la phase précoce [137]. Cette régulation de Creb par l'ATRA via PKC δ avait déjà été démontrée dans un modèle d'épithélium trachéo-bronchique [138] (cf. **Figure 10**, p. 37).

iii. Dans les lymphocytes B

La présence d'une « E-box » (site de fixation du facteur de transcription E2A) au début de l'intron 1 du gène *CD38* a également été décrite, dans une étude sur la LLC. Le SNP rs6449182 C→G donnant naissance à un site de restriction *PvuII* se situe à l'intérieur de cette « E-Box ». E2A joue un rôle important dans la différenciation lymphocytaire B, et dans la recombinaison et la transcription des gènes des immunoglobulines. Il est plus exprimé dans les cellules de LLC et un taux élevé d'E2A nucléaire y est corrélé à une forte expression de surface du CD38. E2A se fixe sur la « E-box » de l'intron 1 du gène *CD38* et son inhibition (par *RNA silencing*) diminue l'expression de surface de CD38 [139]. Dans la même pathologie, en réponse à l'IFN- γ , le facteur T-bet augmente l'expression de *CD38*, en se fixant sur 2 séquences consensus situées au début de l'intron 1, suggérant un rôle de la voie IFN- γ /JAK/STAT/T-bet dans la régulation de ce gène [140].

iv. Dans les lymphocytes T

Dans les lymphocytes T-régulateurs, l'utilisation d'un mutant D910A, dépourvu d'activité kinase, de la sous-unité p110 δ de la PI3 kinase a montré son rôle dans l'activation de l'expression de CD38 en réponse à l'ATRA [141].

D'autres sites putatifs ont été proposés suite à des études *in silico*, mais n'ont pas été validés à ce jour (IRF-1, NF-IL6, TCF- α) [131] (cf. **Figure 10**, p. 37).

b. Régulation post-transcriptionnelle

La régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène *CD38* a été documentée dans les cellules musculaires lisses des voies aériennes, où l'inhibition de la voie Erk par des inhibiteurs pharmacologiques augmente la demi-vie des ARNm *CD38* [134]. Dans ce même modèle cellulaire, le microARN 140-3p (mir140-3p) a été montré comme se liant à l'ARNm *CD38* et diminuant sa stabilité. Un autre indice du lien entre TNF- α et expression de *CD38* est l'inhibition de l'expression de ce miR par cette cytokine. De plus, des oligonucléotides mimétiques du miR140-3p induisent une réduction de l'activation des voies p38 et NF- κ B, et donc indirectement de l'expression de *CD38* (cf. paragraphe précédent) [142]. La même équipe a montré 2 ans plus tard l'interaction du microARN 708 (mir708) avec l'extrémité 3'UTR de l'ARNm *CD38*, avec le même effet déstabilisateur, toujours en réponse au TNF- α . Le mir708 diminue aussi les voies JNK et Akt (par activation des phosphatases MPK1 et PTEN), inhibant également de manière indirecte l'expression de *CD38* [143] (cf. **Figure 10**).

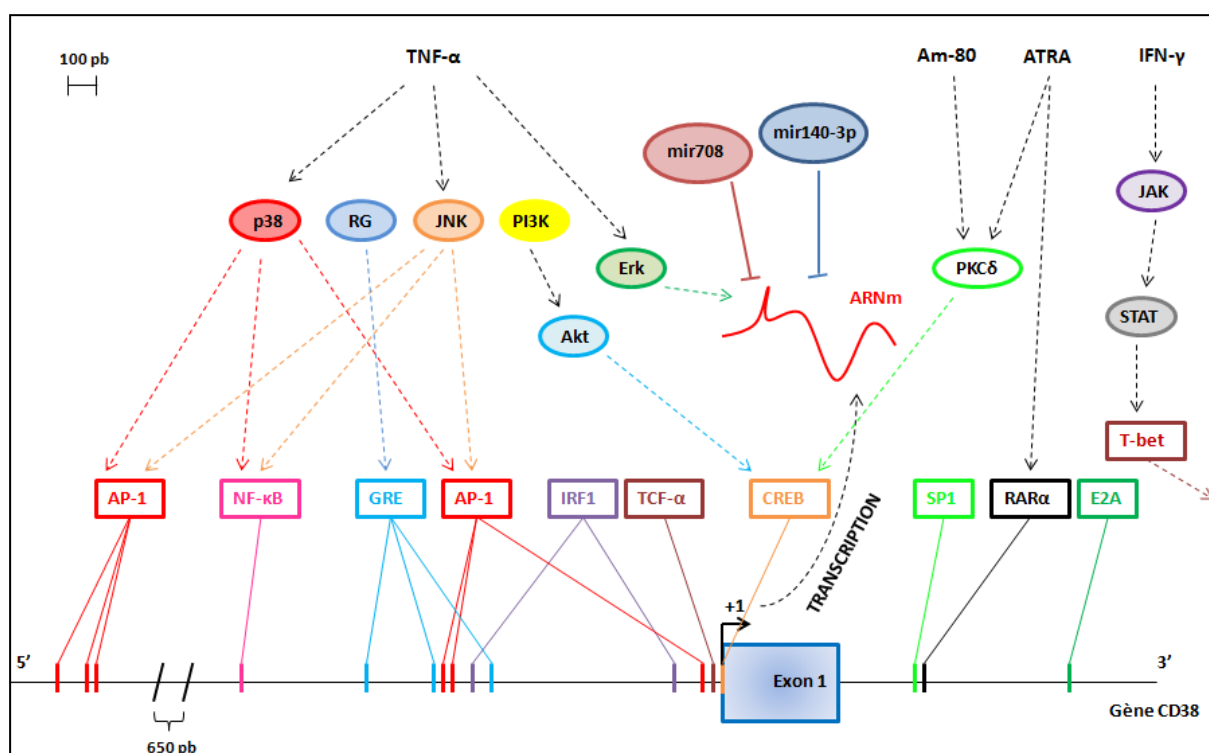


Figure 10 : La régulation du gène *CD38* [131], [132], [134], [136], [138, p. 80], [139], [140], [141, p. 3], [142], [143]. AP-1 : Activator Protein 1 / NF- κ B : Nuclear Factor of kappa-B / GRE : Glucocorticoid Response Element / IRF-1 : Interferon Response Factor 1 / TCF- α : T-Cell Factor alpha / CREB : cAMP response Element Binding protein / RAR α : Retinoïc Acid Receptor α / T-bet : T-cell Specific T-box transcription factor / JNK : Jun N-terminal Kinase / PI3K : Phosphatidyl inositol-3 Kinase / Erk : Extracellular signal-Regulated Kinase / RG : Récepteur aux glucocorticoïdes / JAK : Janus Activated Kinase / STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription / Akt : AKR T Cell Lymphoma / Am-80 : Tamibarotène.

3. La protéine CD38

La protéine CD38 a été découverte en 1980 par Reinherz *et al* lors d'un criblage d'anticorps afin de décrire la différenciation intrathymique [144]. Elle a d'abord été nommée « T10 » en référence à l'anticorps ayant servi à sa détection et référencée comme un marqueur d'activation lymphocytaire. Ce marqueur de surface a depuis été décrit comme exprimé par la plupart des cellules hématologiques. Il est plus fortement exprimé par les cellules lymphoïdes que myéloïdes, et plus par les lymphocytes B que par les lymphocytes T. Dans les cellules B, il est exprimé par les précurseurs, puis son expression diminue lors de la différenciation jusqu'à être absente dans les lymphocytes B naïfs. Après la rencontre avec l'antigène, son expression augmente de nouveau : elle est détectable dans les lymphocytes B mémoires et très forte dans les plasmocytes. Bien que plus faible hors de la sphère hématologique, cette expression est presque ubiquitaire et est retrouvée notamment dans le cerveau, le pancréas, les muscles et les os [145].

La protéine CD38 est une glycoprotéine de type II (ce qui signifie que son extrémité N-terminale est orientée vers l'intérieur de la cellule). Elle est longue de 300 acides aminés et possède un poids moléculaire de 45 kDa. Sa structure comporte une petite queue cytoplasmique (21 AA), une partie transmembranaire (23 AA) et une grande partie extracellulaire (256 AA). La courte queue cytoplasmique de CD38 ne comporte qu'un domaine de liaison au domaine SH2 de la protéine Lck [146]. Cependant, elle ne contient pas de tyrosine phosphorylable, suggérant uniquement un rôle de « *docking* » de CD38 pour Lck et nécessitant donc l'intervention de co-récepteurs afin de transduire un signal. CD38 présente 4 sites de N-glycosylation. Ces motifs saccharidiques représentent 25% du poids moléculaire de cette protéine, et modifient ses propriétés de multimérisation [147] (cf. **Figure 11**).

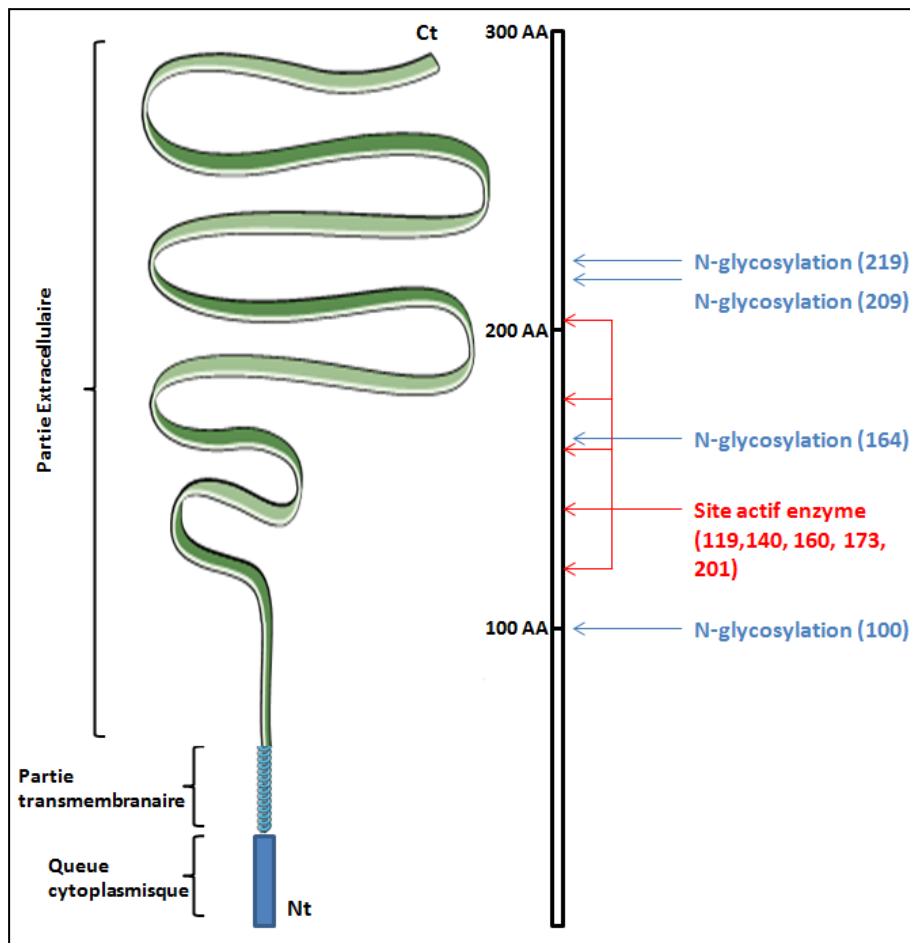


Figure 11 :
Schéma
représentant la
structure de la
protéine CD38.
Source :
UniprotKB

La protéine CD38 a été principalement décrite comme une molécule de surface des cellules animales. Cependant, elle est également exprimée dans le noyau des cellules hématopoïétiques humaines, indépendamment d'une expression de surface [148], [149].

4. Une protéine à activité pléiotropique

Bien que tout d'abord décrite comme un marqueur de différenciation des cellules hématopoïétiques, la protéine CD38 présente de nombreuses autres fonctions biologiques dans ces cellules, mais également dans d'autres organes. C'est une molécule pléiotropique, c'est-à-dire possédant des activités multiples et différentes selon le modèle étudié.

a. Un récepteur de surface

La molécule CD38 participe à la transduction du signal. L'étude de son activité réceptrice de surface et des voies de signalisation associées a été principalement réalisée dans les cellules lymphocytaires.

Bien que possédant une « queue » cytoplasmique courte et quasiment dépourvue de motifs de liaison à des protéines effectrices, CD38 est capable de moduler les signaux de

récepteurs, tels que le BCR, le TCR, le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH de classe II), le CXCR4 ou les tétraspanines (ex : le CD81) [131]. Ainsi, des manipulations réalisées sur des monocytes purifiés à partir de sang humain ont montré une augmentation des flux calciques et de la phosphorylation de c-Cbl, Hck et Fgr (protéines communes à la signalisation du CMH de classe 2). Dans ces cellules, l'augmentation du CMH de classe II diminue l'expression de CD38 [150].

Dans les cellules myéloïdes, l'activation de CD38 favorise le chimiotactisme et la migration transendothéliale dendritique sous influence du CCL-21 ainsi qu'une protection contre l'apoptose induite par la privation en sérum, via une augmentation d'expression de Bcl-2. CD38 promeut également la sécrétion d'IL-12 par ces cellules, favorisant la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes « *T-helper-1* » [151].

Dans les lymphocytes T, CD38 est impliqué dans la sécrétion de cytokines (IL-6, IL-10, IFN- γ , GM-CSF) [152]. Il active également la différenciation T par induction de la prolifération des lymphocytes T2 et de l'apoptose des lymphocytes T1, dépendante d'une voie de signalisation impliquant les tyrosines kinases Lyn, Fyn et Btk, ainsi que PI3K et Erk [153]. Dans la lignée cellulaire Jurkat, la voie CD3- ζ /Lck/ZAP-70/PLC- γ 1/PKC est activée par la stimulation de CD38, prouvant une connexion avec la voie du TCR. La voie Lck/Shc/Raf-1/c-Cbl/Erk1/2 y est également activée par CD38 (cf. **Figure 12, p**) [154]. Cette activation de la voie Erk est particulièrement intéressante au regard de son importance dans la leucémogénèse HCL (cf. p. 17 à 21).

L'activation de CD38 induit la phosphorylation des tyrosines du CD19, aboutissant à une diminution de prolifération des progéniteurs B par l'intermédiaire des protéines kinases Lyn et PI3K, cependant sans qu'il y ait interaction physique entre les 2 récepteurs. En effet, la modulation de l'expression du CD19 ne modifie pas celle de CD38 [155]. Cette interaction semble nécessiter la participation du CD81, car des expériences de co-immunoprécipitations et d'immunofluorescence révèlent la formation d'un complexe CD19-CD81-CD38 dans les lymphocytes B murins [156, p. 81]. Cockayne *et al* montrent une déficience de la signalisation du BCR dans des souris CD38^{-/-} [157]. De plus, l'absence des chaînes IgG α et IgG β dans la lignée de lymphome B murin A20 annihile la sécrétion d'IL-2 en réponse à la stimulation de CD38, prouvant un lien entre le BCR et CD38. Cependant, des expériences de co-immunoprécipitation ne montrent pas d'interaction physique entre ces 2 molécules, argumentant en faveur d'une association CD38-BCR dans un complexe supramoléculaire [158]. Etant donné le rôle du BCR et de sa signalisation dans la pathologie HCL,

l'imbrication de cette voie dans la signalisation de CD38 s'avère particulièrement intéressante (cf. p. 22 à 24).

Dans les lymphocytes B, modèle qui nous intéresse particulièrement, les signaux transduits sont très différents selon le stade de différenciation lymphocytaire. Ainsi, la stimulation de cellules B immatures murines et humaines par des anticorps anti-CD38 conduit à leur apoptose et à une diminution de leur prolifération par l'intermédiaire de Syk, activant PLC- γ 2 puis PI3K. La protéine C-cbl est également activée et s'associe à la PI3 kinase [159]. Il est à noter qu'aucune activation d'autres protéines adaptatrices, telles Fyn, Lyn ou Btk, ni de Vav, ni de Ras-GAP, n'a été détectée, de même pour les kinases Jak 1 et 2 [160], [161]. (cf. **Figure 12, p**). A l'inverse, dans les lymphocytes B matures murins, l'activation du CD38 inhibe l'apoptose et induit la prolifération cellulaire grâce à la voie Btk/PC-PLC/PKC/ NF- κ B et/ou Btk/PLD/PKC/NF- κ B mais indépendamment de la voie PLC- γ 2/IP₃ (la PLC- γ 2 est phosphorylée mais pas sur des résidus activateurs, d'où son absence d'activité dans ces cellules). Cette activation de CD38 conduit à une augmentation de l'expression de la cycline D2, ce qui jouerait sur la prolifération cellulaire. Le recrutement partiel de Btk dans cette voie suggère l'intervention d'autres kinases. Btk serait activée essentiellement par Lyn mais aussi plus faiblement par Fyn [162], [163, p. s] (cf. **Figure 12**). De même, l'activation de CD38 protège de l'apoptose des cellules isolées d'amygdales, qui sont des lymphocytes B issus du centre germinatif. L'apoptose y est inhibée par induction de l'expression de Bcl-2. Cependant, CD38 ne semble pas modifier les propriétés prolifératives de ces cellules [164].

On observe l'implication de voies bien distinctes dans la signalisation induite par CD38 selon le type cellulaire. Seule la protéine C-cbl semble être commune aux lymphocytes B et T, et est également décrite comme phosphorylée dans la lignée myéloïde HL-60 après activation du CD38 [165].

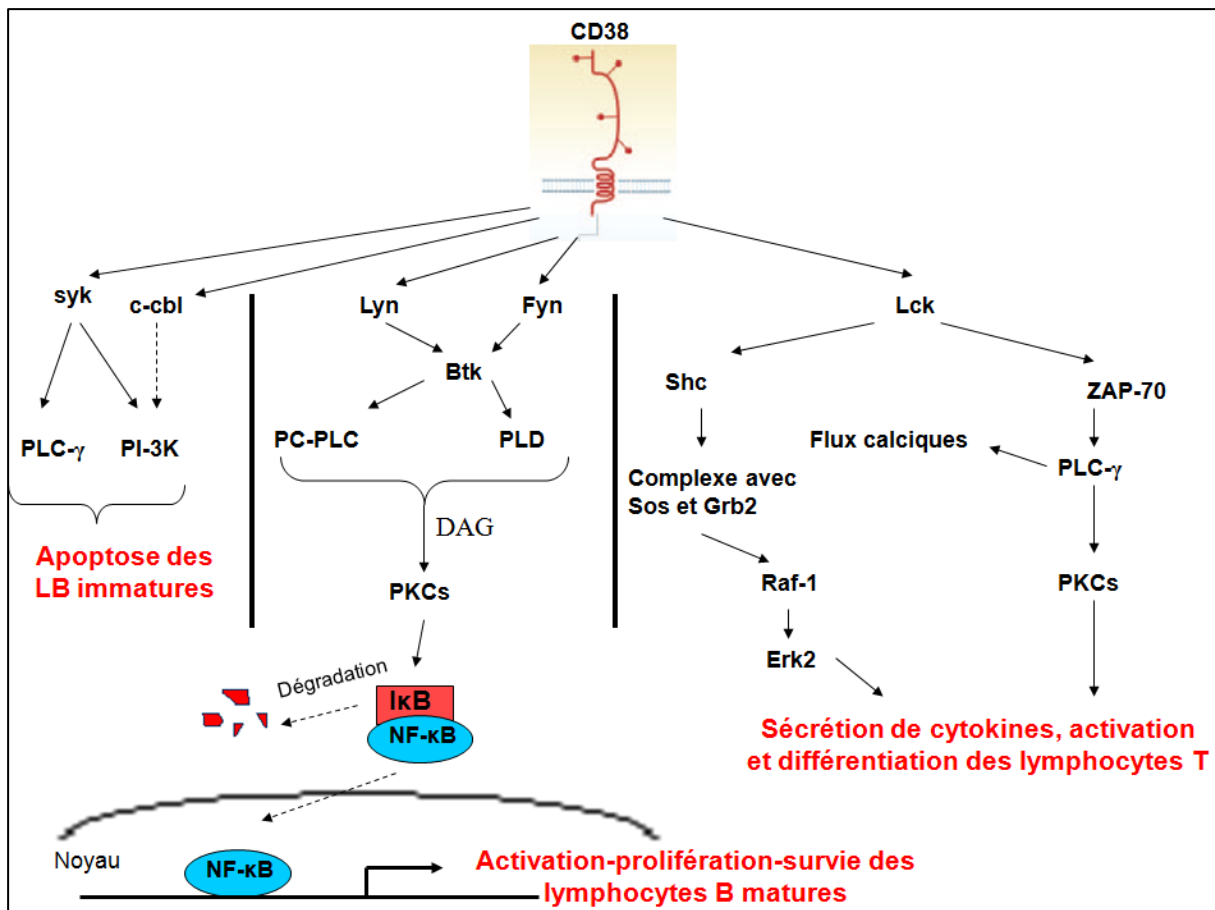


Figure 12 : Voies de signalisation activées par CD38 et conséquences fonctionnelles dans les lymphocytes.

b. Une ectoenzyme

Une seconde propriété prépondérante de la protéine CD38 provient de son activité enzymatique. En effet, la proximité phylogénétique avec l'enzyme soluble d'*Aplysia Californica* la classe dans la famille des ADP-ribosyl-cyclases [166]. CD38 possède un site catalytique enzymatique dans sa partie C-terminale extracellulaire, ce qui en fait une enzyme ancrée à la membrane plasmique. Elle possède pour substrats un ensemble de métabolites dérivés du NAD. Son activité est triple et liée aux conditions de pH : en milieu neutre et basique, c'est principalement une NAD glycohydrolase capable de produire de l'ADPR à partir de NAD et une ADP-ribosyl cyclase et hydrolase catalysant la cyclisation ou l'hydrolyse de l'ADPRc. En milieu acide, c'est une NADP glycohydrolase marginale, formant du NAADP [167] (cf. **Figure 13**) .

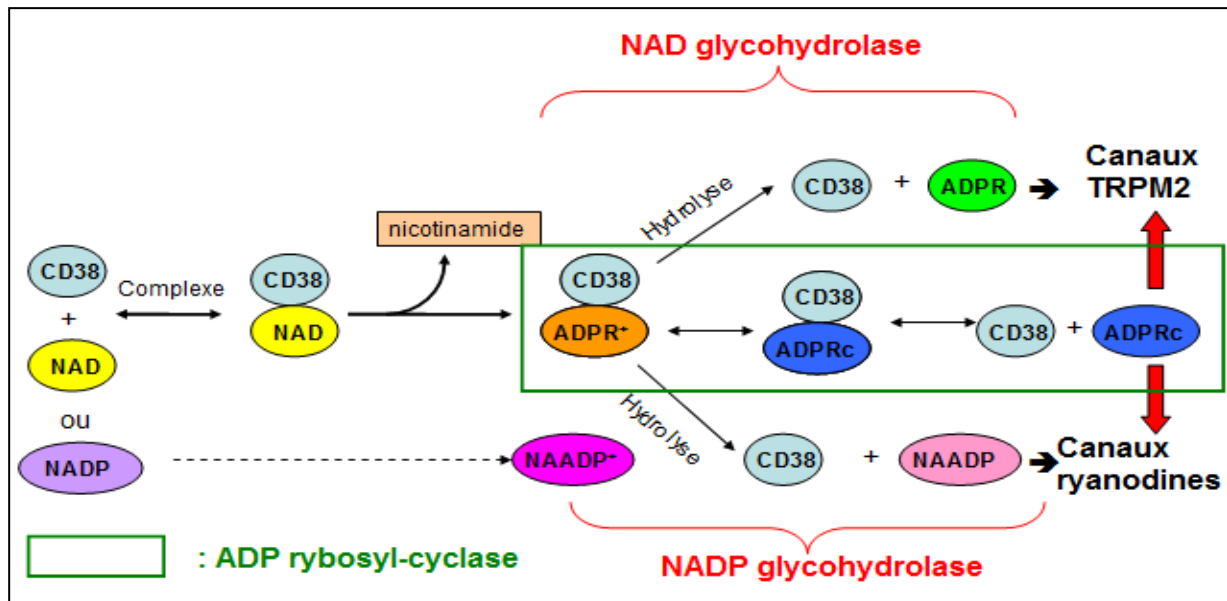


Figure 13 : Activité enzymatique du CD38. Les premières étapes de réaction sont communes à tous les métabolites : formation d'un complexe entre CD38 et NAD (ou NADP) et libération du noyau nicotinamide. L'intermédiaire oxcarbenium (ADPR⁺) est soit hydrolysé, soit cyclisé pour fournir les métabolites terminaux, inducteurs de flux calciques [166], [167].

Ces métabolites sont des inducteurs de flux calciques intracellulaires, indépendamment de l'IP₃. L'ADPRc active les canaux à ryanodine et libère les stocks de calcium du réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique [168]. Il active également les canaux calciques TRPM2 qui permettent de mobiliser le calcium extracellulaire, de manière 100 fois plus intense que l'analogue non cyclique, l'ADPR [169]–[171]. Le NAADP stimule d'autres réserves de calcium intracellulaire [172]. Le CD38 régule donc le pool extracellulaire de NAD, substrat des ADP-ribosyl-transférases pouvant inhiber son activité enzymatique par ribosylation.

Par ailleurs, la N-glycosylation semble importante dans la cinétique de la réaction enzymatique. En effet, la déglycosylation de CD38 par la PNGase-F entraîne une diminution de la vitesse de la réaction mais une augmentation de l'affinité pour le substrat [173].

Une question intrigante s'est rapidement imposée à la communauté scientifique : comment une enzyme, dont le site catalytique est extracellulaire, peut-elle moduler des flux calciques intracellulaires, alors que les métabolites inducteurs de ces flux sont produits à l'extérieur de la cellule et que les substrats de l'enzyme sont présents en abondance dans le cytosol ? Une première hypothèse a été celle d'un transport actif de ces métabolites par des transporteurs annexes, mais l'existence de tels transporteurs n'a pas été vérifiée [174]. Une autre hypothèse propose que la capacité de multimérisation de CD38 puisse former un pore

permettant l'internalisation des produits enzymatiques après leur synthèse. En ce sens, CD38 est capable de se tétramériser à la membrane plasmique. Cette tétramérisation modifie son activité enzymatique, mais la formation d'un tel pore n'a pas encore été prouvée [175], [176]. Une troisième possibilité est le passage de la protéine CD38 d'une forme de type II à une forme de type III, c'est-à-dire que la partie C-terminale porteuse du site catalytique passerait du milieu extracellulaire à intracellulaire par retournement de la protéine, par un mécanisme de « *flip flop* ». Grâce à des anticorps ciblant spécifiquement les parties Ct et Nt de CD38, Zhao *et al* ont mis en évidence l'existence d'une forme minoritaire de type III (représentant 10 à 20% de la protéine de surface) dans des cellules sanguines purifiées de sujets sains. La phosphorylation de 3 résidus de sérine dans la partie Nt pourrait causer un excès de charges négatives à la membrane plasmique provoquant le « *flip-flop* » [177].

Outre la forme transmembranaire de CD38, des formes solubles et polymériques de CD38 ont été décrites. Elles sont au nombre de 3 : p39 (monomérique), p78 (dimérique) et p190 (tétramérique). L'assemblage de ces formes solubles n'a pas été décrit, mais la présence d'une forme p39 tronquée de la partie membranaire de la protéine suggère un clivage enzymatique ou un épissage alternatif. Or, les transcrits alternatifs *CD38* décrits jusqu'alors ne présentent pas de délétion de l'exon 1 codant pour la partie intracellulaire et transmembranaire (mais uniquement de l'exon 3 [130]) ; le clivage de CD38 par la protéase de *Staphylococcus aureus* produisant une forme de 39 kDa, l'hypothèse d'un clivage protéolytique est donc la plus probable. Cependant, la possibilité d'une association à la membrane suivie d'un clivage protéolytique ou de la libération d'une forme monomérique qui se polymérise sous forme soluble reste à étudier [178], [179]. Ces formes solubles sont porteuses de l'activité enzymatique de CD38, activité plus faible pour p39 que pour la forme transmembranaire p45 avec le même rapport activité cyclase/activité hydrolase. La forme p190 favorise beaucoup plus l'activité cyclase. Ces formes solubles pourraient entrer en compétition avec la forme transmembranaire pour les substrats enzymatiques.

D'un point de vue fonctionnel dans les cellules hématologiques, la production de métabolites inducteurs de flux calciques par le CD38 augmente la prolifération des lymphocytes B spléniques murins [166]. La production d'ADPRc par CD38 dans les neutrophiles et les cellules dendritiques modifie leurs propriétés migratoires. Ainsi, des souris *CD38*^{-/-} présentent une sensibilité accrue à l'infection par *Staphylococcus pneumoniae* et un défaut de migration de leurs neutrophiles vers les sites infectieux [180]. CD38 favorise la migration des monocytes en réponse aux cytokines inflammatoires, tels les ligands du

CXCR4, le CCR1 et le CCR5 [181]. Dans les cellules dendritiques, il joue sur le même phénomène en réponse à CXCL12, CCL19 et CCL21 [182]. De plus, dans certains lymphocytes, l'IL-8 (Interleukine-8) stimule la production d'ADPRc par le CD38 et conduit à l'augmentation de la migration des cellules LAK (*Lymphokine Activated Killers*) [183].

Il est intéressant de noter une certaine indépendance entre eux des phénomènes impactés par les fonctions de CD38 : réceptrices d'une part, et enzymatiques d'autre part. Ainsi, l'effet pro-apoptotique de la stimulation de CD38 dans les lymphocytes B immatures semble indépendant de la production d'ADPRc [161]. La fonction réceptrice de CD38 semble moduler des signaux liés à la mort et la prolifération des cellules tandis que sa fonction enzymatique, par l'activation des flux calciques, agit plutôt sur des phénomènes de migration cellulaire.

c. Une molécule d'adhérence

L'implication de CD38 dans les phénomènes d'adhérence cellulaire a été découverte plus tardivement que ses deux autres fonctions. L'incubation d'un anticorps anti-CD38 avec des lymphocytes T a montré une diminution de l'adhérence de ces cellules à l'endothélium [184]. Cette molécule est responsable d'une interaction faible avec les cellules endothéliales, à la manière des sélectines. Deaglio *et al* ont démontré que le partenaire d'interaction de CD38 était le CD31 (ou PECAM-1 pour *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*), un membre de la famille des immunoglobulines. Cette protéine est un récepteur-ligand de 130 kDa, fortement exprimé à la surface des cellules endothéliales, mais également par les cellules stromales. Outre ces mécanismes d'adhérence cellulaire, les interactions CD38-CD31 sont capables d'induire la signalisation cellulaire par activation de CD38 (de la même manière que des anticorps agonistes de CD38), d'activer des flux calciques et d'induire l'expression de cytokines (IL-6, IFN- γ , IL-10, GM-CSF, IL-2) par des lymphocytes T purifiés [185].

CD38 possède 2 motifs de liaison au hyaluronate (HA), un glucosaminoglycane de la matrice extracellulaire, particulièrement présent dans la moelle osseuse (cf. **Figure 14**) [38], [186]. Ces motifs, dont la séquence en acides aminés est [B(X₇)B] où B est un acide aminé basique (lysine ou arginine) encadrant 7 acides aminés X non acides, ont une structure analogue à ceux du CD44, une glycoprotéine de surface évoquée plus haut (p. 12) comme étant exprimée par les tricholeucocytes et importante dans l'ancrage des cellules HCL à la moelle osseuse, donc dans l'installation de la myélofibrose (cf. **Figure 4, p. 13**) [39]. Le CD44 possède 4 de ces motifs.

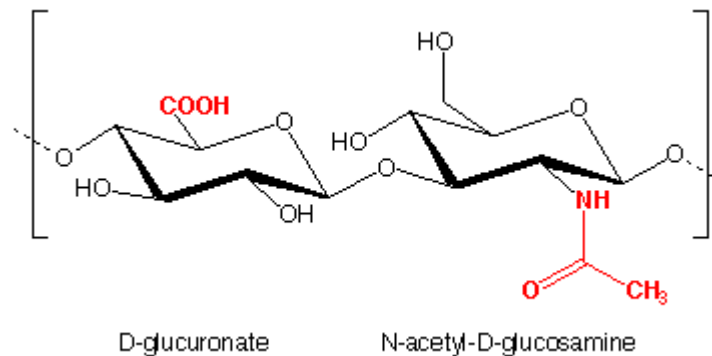


Figure 14 : Structure du hyaluronate (HA). Le hyaluronate est un polymère d'acide glucuronique (résidu de gauche) et de N-acétyl-glucosamine (résidu de droite).

5. CD38 hors de la sphère hématologique

CD38 étant une protéine exprimée de manière ubiquitaire, son rôle dans de nombreuses fonctions physiologiques a été étudié et s'est souvent révélé déterminant.

CD38 est impliqué dans la sécrétion de l'ocytocine, hormone sécrétée durant l'accouchement et provoquant les contractions utérines. Cette hormone est également associée au développement du langage et du lien maternel et social. Ainsi, des souris *CD38*^{-/-} ont montré des déficiences dans leurs comportements maternel et d'interaction sociale dues à un défaut de sécrétion d'ocytocine, et compensées par l'administration sous-cutanée d'ocytocine ou l'expression ectopique de CD38 au niveau de l'hypothalamus [187]. Dès lors, son implication dans les troubles autistiques a fait l'objet d'une attention particulière. Ainsi, chez des sujets humains, deux polymorphismes sur le gène *CD38* (rs6449182 et rs3796863) ont été associés à une modification de la réceptivité au partenaire et aux émotions positives [188]. De plus, une délétion 4p15.32, aboutissant à un transcrit de fusion entre les gènes *BST1* et *CD38*, a été observée chez une enfant présentant des troubles autistiques plus sévères que sa sœur jumelle qui, par mosaïcisme, ne présente pas cette délétion [189]. Actuellement, des essais cliniques sont en cours pour évaluer l'intérêt d'utiliser des sprays nasaux d'ocytocine chez des individus autistes afin d'évaluer l'amélioration de leurs performances cognitives.

L'axe CD38/ADPRc/canaux ryanodines a été proposé comme impliqué dans la voie stimulatrice de sécrétion d'insuline. Ainsi, des souris KO pour le gène *CD38* montrent une intolérance au glucose, avec un niveau de glucose circulant plus élevé que les souris « contrôle ». Leurs cellules pancréatiques β des îlots de Langerhans montrent un déficit de

production d'ADPRc et une libération sous-jacente de calcium intracellulaire, activant la sécrétion d'insuline en réponse au glucose [190]. Il a été montré que l'auto-immunité contre CD38 est impliquée dans l'inhibition de la sécrétion d'insuline dans le diabète insulino-dépendant, en inhibant son activité enzymatique [191]. De même, une mutation R140W, inhibitrice de l'enzyme, a été découverte dans le gène *CD38* chez des patients diabétiques [192].

CD38 a également été étudié en infectiologie. Cette protéine est capable de diminuer la capacité d'infection des lymphocytes T par le VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine). En effet, elle inhibe l'interaction entre la protéine de l'enveloppe virale gp120 et le CD4 des lymphocytes T, conférant une protection accrue de ces cellules T4 contre la fusion des membranes du virus et de la cellule hôte. La zone d'interaction entre gp120 et CD38 a été déterminée : il s'agit de la boucle V3 de gp120 [193]. La modélisation de cette boucle fournit une nouvelle stratégie thérapeutique et constitue une base pour la création de nouvelles molécules mimant cette interaction (tels des peptides bloquants), avec un effet potentiellement anti-rétroviral [194]. Un autre effet protecteur de CD38 est la production de nicotinamide dans l'environnement du lymphocyte T, lors de l'étape de cyclisation de l'ADPRc à partir du NAD (cf. **Figure 13, p. 43**). Ceci produit un pool de nicotinamide, permettant de contrecarrer la déplétion en nucléotides induite par la réplication du virus. L'apoptose des cellules T4 est ainsi limitée, ce qui permet de retarder la phase d'immunodéficience des patients et la survenue de maladies opportunistes. Un effet délétère de CD38 sur la pathologie est cependant à déplorer : les lymphocytes T CD38⁺ sont activés et donc fortement réplcatifs pour le VIH. L'activation du CD4 par le CD38 favorise la migration des LcT infectés vers les organes lymphoïdes secondaires et donc leur réplication et celle du virus [195].

La régulation du gène *CD38* a été très étudiée dans le modèle des cellules musculaires lisses des voies aériennes (cf. p. 35) car la protéine CD38 contrôle l'homéostasie du calcium, impliquée dans les phénomènes d'asthme. Les flux calciques intracellulaires sont nécessaires à la contraction de ces cellules musculaires lisses et à la respiration, notamment via l'ADPRc produit par CD38 qui active les canaux ryanodines du réticulum sarcoplasmique, libérant les réserves de calcium [196]. Certaines cytokines inflammatoires, telles le TNF- α ou l'IL-13, favorisent l'expression de CD38, augmentant ainsi le pool d'ADPRc et potentialisant les flux calciques en réponse à des molécules de la réponse allergique, telle l'histamine [197]. L'utilisation de glucocorticoïdes (ex : la dexaméthasone) permet de diminuer ce phénomène

allergique, notamment en diminuant l'expression de CD38 via les récepteurs aux glucocorticoïdes (GRE) [132].

L'ensemble de ce chapitre nous a montré que CD38 est une protéine à l'activité multiple, étant à la fois un récepteur, une enzyme et une molécule d'adhérence. Elle joue un rôle important dans de nombreuses fonctions biologiques, non seulement hématologiques mais également dans la physiologie de nombreux autres organes. Son rôle dans la biologie des leucocytes, dans des phénomènes aussi importants que la survie, la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhérence cellulaire laisse présager de son importance capitale dans le développement des hémopathies malignes B. Ainsi, nous allons voir que son expression et/ou sa dérégulation influent sur la leucémogénèse. Nous nous intéresserons surtout aux hémopathies malignes B lymphoïdes.

IV. CD38 dans les hémopathies malignes :

L'expression large de CD38 dans les cellules hématologiques soulève la question de son étude sur un panel étendu d'hémopathies malignes. Par souci de clarté, nous nous intéresserons uniquement aux pathologies où il a été le plus étudié et pour lesquelles les résultats des travaux sont les plus prometteurs.

1. CD38 dans la Leucémie Aigue Myéloïde

Cette hémopathie se traduit par un envahissement de la moelle osseuse et du sang par des cellules leucémiques appelées blastes, issues des précurseurs myéloïdes bloqués au cours de leur différenciation. Cette pathologie est justement classée en 5 sous-types principaux dit FAB (pour *French American British*) selon le stade de différenciation, de M0 à M5, M0 étant le moins différencié et M5 le plus différencié [198].

CD38 a été assez peu étudié dans cette pathologie, où il a été principalement utilisé comme marqueur de la différenciation des blastes ; son expression, quasi-nulle au stade M0, augmente au fur et à mesure de la classification FAB, suivant le même pattern d'expression que celui de la différenciation des cellules myéloïdes normales. L'absence d'expression de CD38 étant un signe d'immaturité des blastes, Ce marqueur est d'ailleurs utilisé comme

caractéristique de la population de cellules souches leucémiques, comme il l'est pour les cellules souches hématopoïétiques normales [199].

CD38 semble cependant exercer un rôle plus important que celui de simple marqueur de différenciation. En effet, son activation a montré l'induction de la prolifération des blastes et inhibe leur différenciation, argumentant en faveur d'un rôle plutôt délétère sur l'évolution de la leucémie [200], [201]. La balance entre les taux d'expression du CD38 et du CD31 par les cellules leucémiques est impliquée dans l'ancrage des blastes à la niche médullaire. En effet, la présence d'un excès de CD31 à la surface des blastes augmente la migration transendothéliale par interaction homotypique avec le CD31 des cellules endothéliales, alors qu'un excès de CD38 favorise l'ancrage des cellules leucémiques dans la moelle osseuse par interaction en son sein de CD38 avec le hyaluronate. Ainsi, les patients présentant une expression accrue de CD31 par rapport à CD38 montrent une leucocytose sanguine plus élevée [202].

2. CD38 dans le Myélome Multiple

Le myélome multiple (MM) est caractérisé par une prolifération anarchique de cellules monoclonales plasmocytaires, produisant massivement de l'IgM. Cette parenté avec les plasmocytes, cellules terminales de la lignée lymphocytaire B, explique la forte expression de CD38 par les cellules de MM. Les traitements de référence combinant inhibiteurs du protéasome [bortézomib (BOR) et plus récemment, carfilzomib (CAR)] avec des immunomodulateurs [thalidomide, lenalidomide (LEN) et dernièrement, pomalidomide (POM)] se révèlent relativement efficaces en première ligne, mais des rechutes fréquentes dues à des formes réfractaires à ces molécules surviennent rapidement, avec une médiane de survie de 9 mois pour les patients rechutant après un traitement combinant lenalidomide et bortézomib [203].

Trois anticorps monoclonaux thérapeutiques ciblant CD38 sont en cours d'essais cliniques dans les formes réfractaires de la pathologie [204] :

1) le daratumumab est un anticorps humanisé développé par la société Genmab® et commercialisé par Johnson & Johnson®. Il est capable d'induire une forte réponse ADCC, CDC et ADPC sur des lignées cellulaires ou des cellules isolées de patients de MM, indépendamment du stroma médullaire [205], [206]. De manière intéressante, une synergie d'action a été observée lors d'études précliniques en association avec le lenalidomide et le

bortezomib [207]. Son développement clinique est le plus avancé, avec une évaluation seul ou en combinaison avec des immunomodulateurs que sont le lénalidomide et la dexaméthasone (DEX). Chez les patients réfractaires ou en rechute, en monothérapie, les premiers résultats des études de phases I et II montrent un maximum de 42% de réponses partielles, avec une survie sans progression de 70% à 6 mois. En combinaison avec « LEN+DEX », les premiers résultats indiquent 100% de patients répondeurs, dont une moitié avec une réponse excellente [203]. L'étude de phase III cherchant à montrer le bénéfice thérapeutique de l'ajout du daratumumab à l'association « LEN+DEX » chez les patients non traités est en cours de recrutement (NCT02252172, <http://clinicaltrials.gov>).

2) le MOR03087, développé par de la société MorphoSys[®], est un anticorps humain. Il est actuellement en phase I/II et testé en monothérapie ou en combinaison avec DEX ou « LEN + DEX » ou « POM + DEX ». Ces essais cliniques sont actuellement à l'étape de recrutement des patients (NCT01421186).

3) le SAR650984, de la société Sanofi-Aventis[®], est un anticorps humanisé capable d'induire une réponse ADCC et CDC sur des lignées de MM. Son interaction avec CD38 est également capable d'induire directement l'apoptose sans intervention du système immunitaire [208]. Son évaluation clinique, testée en phase I en monothérapie (NCT01084252), ou en combinaison avec « LEN+DEX » (NCT01749969), ou « POM+DEX » (NCT02283775) ou avec le carfezomib (NCT02332850) est également en cours de recrutement.

L'émergence d'un nouveau paradigme dans le MM renforce l'impact de CD38 sur le microenvironnement tumoral. En tant que site de génération de la multitude de cellules hématopoïétiques, la moelle osseuse est le lieu où de nombreuses ectoenzymes (exprimées à la surface de ces cellules) peuvent agir en réseau. CD38 a été proposé comme membre de la chaîne réactionnelle aboutissant à un enrichissement de cette niche médullaire en adénosine (ADO). L'ADO y agirait comme un modulateur immunologique, favorisant la persistance des cellules tumorales par promotion de la survie et de la prolifération des cellules leucémiques et par immunosuppression au niveau du microenvironnement médullaire. [209] (cf. **Figure 15**).

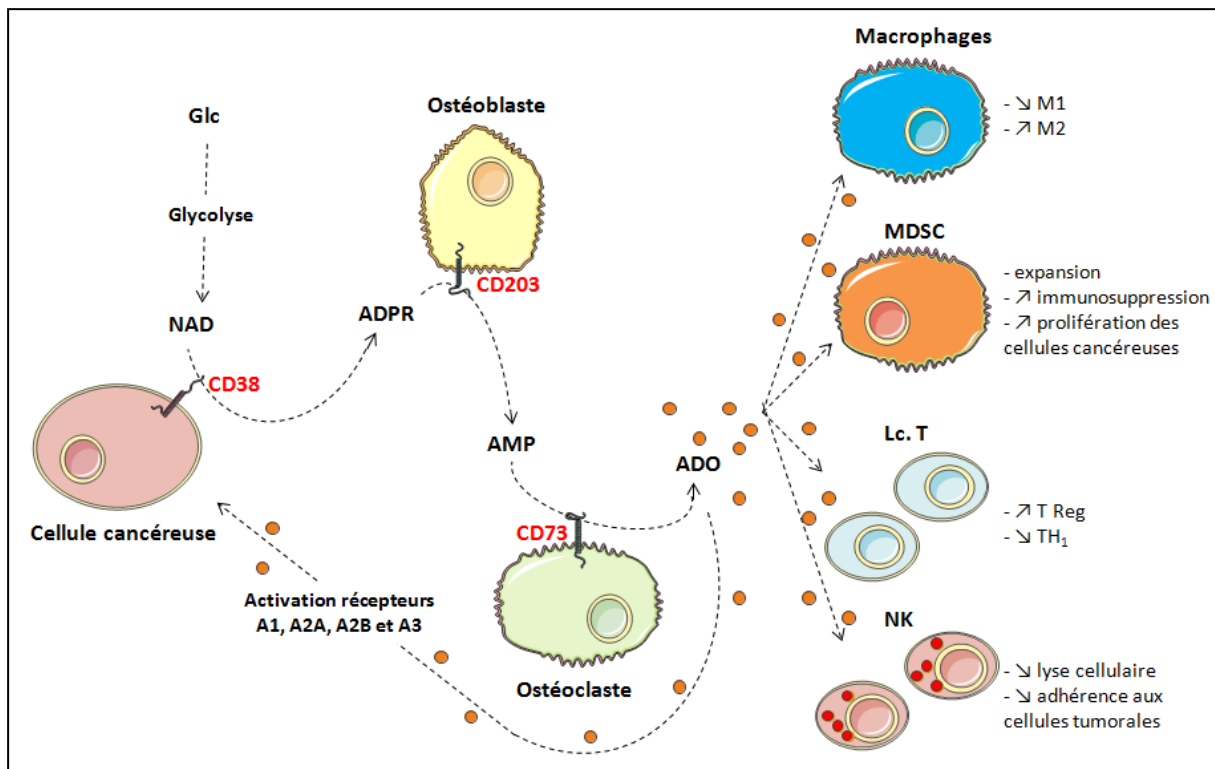


Figure 15 : Production d'adénosine et effets sur le microenvironnement médullaire et la progression tumorale. La niche médullaire fournirait un environnement hypoxique favorable à une glycolyse accrue, augmentant la concentration locale en NAD. La proximité spatiale dans la niche médullaire des cellules cancéreuses, des ostéoblastes et des ostéoclastes rend possible la mise en place de la chaîne de production d'adénosine (ADO). CD38 hydrolyse le NAD en ADPR, qui est ensuite transformé en AMP par PC-1/CD203 (coupant la liaison phosphodiester), lui-même déphosphorylé en ADO par CD73. L'ADO diminuerait ensuite l'activation des cellules effectrices de l'immunité. Ainsi, l'ADO et ses récepteurs modifient la balance entre les macrophages de type M1 anti-tumoraux et de type M2 pro-tumoraux, en faveur de ces derniers. L'ADO permet également l'accumulation de cellules MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cells* ; cellules possédant des caractéristiques communes aux macrophages M1 et M2 et qui facilitent la croissance des cellules tumorales ainsi que la suppression de la surveillance immunitaire). L'activité des lymphocytes T effecteurs est elle aussi diminuée par l'ADO, notamment par la promotion de l'activation des lymphocytes T régulateurs. Enfin, l'ADO limite l'exocytose des granules des cellules NK et leur adhérence aux cellules tumorales, diminuant ainsi la lyse par ces cellules. L'ADO est également capable de promouvoir la prolifération et la survie des cellules cancéreuses par activation des récepteurs à adénosine (A1, A2A, A2B et A3). Glc : Glucose, Lc. : Lymphocytes, NK : *Natural Killers*. D'après Antonioli *et al* et Quarona *et al* [209], [210].

La présence d'ADO dans le plasma médullaire de patients atteints de MM aurait été détectée. Son réel impact sur le développement des cellules tumorales reste cependant à prouver [210].

3. CD38 dans les lymphomes B

L'impact de CD38 sur le développement des lymphomes n'a jamais été formellement étudié. Une étude a montré son expression dans environ 30% de lymphomes de la zone

marginale et des lymphomes du manteau, ainsi qu'une expression dans 77% des lymphomes folliculaires [211].

Les anticorps ciblant CD38 se sont révélés efficaces dans des modèles cellulaires de lymphomes *in vitro* mais aussi *in vivo*. Le SAR650984 est ainsi capable d'induire l'apoptose et une réponse ADCC, CDC et ADCP contre des lignées cellulaires CD38⁺, de même qu'une amélioration de la survie des souris « xénogreffées » et une diminution de la taille des tumeurs [208]. Le daratumumab induit une réponse CDC et ADCC, ainsi qu'une diminution de la progression tumorale sur des xénogreffes de la lignée cellulaire CD38⁺ Daudi [205], de même qu'une réponse ADCP sur un panel de lignées de lymphomes [206]. Notons que l'induction d'apoptose médiée par la voie de signalisation du CD38 (et pas par les cellules de l'immunité) n'a pas été étudiée pour le daratumumab. L'évaluation clinique de ces anticorps dans les lymphomes B est en cours (NCT02413489 pour le daratumumab, en recrutement de phase II, et NCT01084252 pour le SAR650984, au même stade des essais cliniques).

4. CD38 dans la Leucémie Lymphoïde Chronique

a. Du marqueur à l'acteur

La leucémie lymphoïde chronique est une hémopathie maligne caractérisée par une expansion clonale de lymphocytes B matures et activés, probablement issus du centre germinatif. Les cellules leucémiques expriment le CD19, le CD5 et le CD23 [81]. Son évolution est très hétérogène, certains patients pouvant ne jamais avoir besoin de traitement et d'autres présentant des formes très agressives et réfractaires aux traitements. Historiquement, les scores de Rai et Binet permettent de classer des populations de patients à faible, moyen et haut risques [212], [213]. Cependant, ces classifications restent trop vagues pour prédire la progression de la maladie dans les stades de bas et moyen risques. Ces quinze dernières années ont vu émerger de nouveaux marqueurs pronostiques pour cette leucémie. Ainsi, un statut non ou peu muté des gènes *IGVH* est associé à un mauvais pronostic [214]. De même, la protéine ZAP-70, une tyrosine kinase normalement peu présente dans les lymphocytes B, est exprimée dans la LLC. Dans ces cellules, elle facilite la transduction du signal issu du BCR et son taux d'expression est corrélé à un phénotype plus agressif de la maladie [215]. Enfin, CD38 est également connu dans cette leucémie pour être un facteur de mauvais pronostic [216], [217]. Son taux d'expression chez les patients est variable dans le temps, et peut atteindre 25% [218].

En plus d'être un marqueur prédictif d'un mauvais pronostic et associé à un stade de maturation avancé des cellules de LLC, CD38 joue un rôle actif dans le développement de la pathologie, et particulièrement dans l'entretien et l'amplification de signaux moléculaires initiés par les interactions des cellules leucémiques avec le microenvironnement ganglionnaire.

L'approche transcriptomique a montré que la fraction de cellules CD38⁺ possède une signature d'augmentation des gènes de survie cellulaire (et notamment la surexpression du VEGF et de la protéine anti-apoptotique Mcl-1) [219]. L'activation de CD38 par son récepteur-ligand CD31 favorise la prolifération et la survie des cellules, en augmentant notamment les taux de CD100, une sémaphorine connue pour promouvoir ces phénomènes dans la LLC. Cette activation est associée à une colocalisation du complexe CD19/BCR avec CD38, lui suggérant un rôle de corécepteur potentialisant l'activation du BCR [220]. De plus, l'activation de CD38 par un anticorps agoniste conduit à la phosphorylation de ZAP-70, et les populations de patients CD38⁺/ZAP-70⁺ présentent des formes de la maladie encore plus agressives [221].

CD38 contribue également à l'adhérence des cellules leucémiques à l'endothélium grâce au CD31 [222]. L'interaction CD38/CD31 induit ainsi l'activation de gènes de survie (tels *P19*, *BAX*, *BCL-RAMBO*, *BIM*, *PUMA*...) mais également de prolifération (voie du BCR, MAP-kinases, TLR, mTOR...), de gènes de migration (gènes de réorganisation du cytosquelette, de la migration transendothéliale) et d'ancrage (gènes d'adhésion focale), ce qui est particulièrement intéressant à noter dans le contexte où les cellules de l'endothélium du stroma médullaire expriment CD31, fournissant une niche de développement aux cellules leucémiques [223]. L'expression de CD38 est en effet plus élevée dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques, riches en cellules endothéliales, qui sont des sites permissifs à la multiplication de ces cellules [224]. De plus, cette protéine favorise la réponse à CXCL12 chez des patients LLC et donc la migration de ces cellules *in vitro* en chambre de Boyden et vers les niches médullaire et splénique, dans un modèle murin NOD/SCID [221], [225].

Une étude récente a montré que l'activité enzymatique de CD38 était nécessaire à son action dans la maladie. En effet, l'utilisation d'un mutant de CD38 possédant une mutation ponctuelle E226D inactivant le site catalytique de l'ectoenzyme dans la lignée cellulaire Mec-1 conduit à une diminution des flux calciques, de la fixation au CD31 et à VCAM-1 (*Vascular*

Cell Adhesion Molecule-1), de la réponse aux cytokines CCL19, CXCL12 et CXCL10, ainsi qu'à une diminution de l'agressivité de la leucémie *in vivo* [226].

Le concept de promotion de l'immunosuppression induite par l'adénosine au niveau du microenvironnement tumoral, développé dans le paragraphe précédent sur le myélome multiple, est également applicable dans la LLC. Les cellules stromales lymphatiques expriment CD39, qui hydrolyse l'ATP en AMP, et les pro-lymphocytes du centre germinatif expriment CD73. Ces 2 types cellulaires, en présence des cellules de LLC exprimant CD38, permettrait à la chaîne réactionnelle aboutissant à la synthèse de l'ADO de fonctionner dans les ganglions lymphatiques. L'ensemble contribuerait à un environnement immunosuppresseur favorable au développement des cellules leucémiques [209].

CD38 se présente donc comme une molécule pivot dans cette pathologie, à la fois marqueur pronostique, récepteur induisant des signaux de survie et de prolifération et molécule d'adhérence favorisant les interactions avec le microenvironnement.

b. Considérations thérapeutiques

Ce rôle de CD38 dans la LLC, fonctionnellement capital et définissant une sous-population de cellules à haut potentiel leucémique à éradiquer, a logiquement soulevé la question de son utilisation thérapeutique. La stratégie de ciblage par des anticorps se liant à CD38 et induisant des mécanismes cytotoxiques ADCC, CDC et ADCP est la plus logique et la plus évidente. Cependant, bloquer les mécanismes de transduction du signal ou l'interaction de CD38 avec le microenvironnement pourrait également s'avérer efficace.

Le daratumumab a montré aussi son efficacité sur des cellules de LLC. De manière étonnante, le SAR650984 est pour l'heure le seul anticorps monoclonal thérapeutique en cours d'essai clinique dans la LLC chez les patients CD38⁺, actuellement en phase I/II et à l'étape de recrutement (NCT01084252) [204].

L'utilisation d'un inhibiteur enzymatique de CD38, la kuromanine (famille des flavonoïdes), a montré une forte activité antileucémique dans un modèle murin NSG, en diminuant la greffe sanguine et l'infiltration médullaire, splénique, hépatique et rénale de la lignée cellulaire Mec-1 [226].

La LLC possède des caractéristiques communes avec l'HCL. Ces deux leucémies possèdent des profils d'évolution clinique lente, avec des profils d'expression génique les apparentant aux lymphocytes B mémoires [8], [9]. Elles montrent toutes deux peu d'altérations chromosomiques ou de mutations ponctuelles récurrentes [58], [81]. Les signaux du

microenvironnement, médullaire et splénique pour l'HCL, mais également ganglionnaire pour la LLC, sont importants dans le maintien et la dissémination des cellules leucémiques [42], [81]. Avec une limite de positivité fixée à 30%, environ un tiers des patients expriment CD38 dans ces 2 hémopathies malignes [218], [227]. CD38 est connu pour gouverner les phénomènes de prolifération dépendant du microenvironnement dans la LLC [222]. L'ensemble de ces similitudes renforcent l'intérêt d'une étude du rôle pronostique et fonctionnel de CD38 dans la tricholeucocytose.

Ce chapitre nous a montré que CD38 constitue une cible intéressante dans les hémopathies malignes, avec des anticorps thérapeutiques ayant montré leur efficacité préclinique dans le MM et les lymphomes B. Son intérêt thérapeutique ne réside pas uniquement dans le ciblage de sa forme transmembranaire : sa capacité à moduler la survie et la prolifération cellulaire, son rôle de molécule d'adhérence capable d'influer sur les signaux du microenvironnement, son implication dans la voie de production de l'ADO aboutissant à une anergie du système immunitaire, l'ensemble de ces rôles en fait un acteur essentiel de la progression tumorale. Ce rôle n'est cependant pas clairement prouvé dans l'HCL. En ajoutant à ces effets potentiellement pro-tumoraux l'imbrication de la voie de signalisation de CD38 avec celle du BCR, et la production de médiateurs inducteurs de flux calciques dans un contexte où ceux-ci sont anormalement élevés, l'élucidation de l'impact de CD38 sur la progression tumorale de l'HCL semble un enjeu scientifique et thérapeutique important.

OBJECTIFS

L'HCL étant une leucémie contre laquelle les praticiens hospitaliers disposent de traitements de première ligne efficaces, le principal intérêt de la recherche biomédicale dans ce domaine réside dans la prévention des rechutes de la maladie et dans le traitement des formes d'HCL réfractaires à ces traitements de référence. Il est donc nécessaire de définir les marqueurs potentiellement prédictifs de ces rechutes, et de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour développer de nouvelles molécules efficaces contre ces formes réfractaires.

Les travaux précédemment menées par les Docteurs Galiègue-Zouitina et Shelley ont conduit à la découverte de la sous-expression de RhoH dans l'HCL, et de son implication dans les phénomènes de croissance cellulaire, d'adhérence homo- et hétérotypique et de migration transendothéliale. De plus, l'expression ectopique de RhoH dans le modèle cellulaire HCL JOK-1 a montré une diminution de la taille des tumeurs lors de xénogreffes dans un modèle murin immunodéficient [110]. Afin de déterminer les cibles moléculaires de RhoH responsables de cette diminution du phénotype leucémique, une étude transcriptomique par *microarrays*, comparant les taux d'expression des ARNm dans la lignée JOK-R (pour JOK-RhoH, exprimant de manière stable le vecteur d'expression *pMEP4-RHOH*) avec ceux de la lignée JOK-E (pour JOK-Empty, exprimant de manière stable ce même vecteur d'expression vide) a montré l'induction par RhoH d'une diminution de l'expression des transcrits du gène *CD38*, d'un facteur 7.

Les objectifs de ce travail doctoral ont donc été :

- 1) de confirmer les données de transcriptome sur la diminution de l'expression du gène *CD38* dans le modèle JOK-E / JOK-R.
- 2) d'étudier la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de *CD38* par RhoH dans ce même modèle, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires modulés par cette petite protéine G dans l'HCL et de découvrir de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.
- 3) d'élucider l'impact fonctionnel de la protéine CD38 sur le développement leucémique HCL *in vitro* et *in vivo*, en étudiant son rôle dans divers phénomènes impliqués dans la progression de la leucémie (prolifération, survie, adhérence cellulaire, migration transendothéliale).

I. Techniques de biologie cellulaire

1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires d'HCL (JOK-1, Eskol, EH, HC-1, Hair-M, Bonna-12, JOK-WT et JOK-KO, HC-1 WT et HC-1 KO) utilisées pour cette étude sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 + Glutamax (Gibco®), complété par 10% de SVF décomplémenté, 100 U/mL de Pénicilline et 100µg/mL de Streptomycine (Gibco). Les lignées cellulaires JOK-E et JOK-R ont été obtenues par transfection stable d'un vecteur plasmidique *pMEP4* (cf. **Annexe 1.A**) permettant la surexpression de RhoH (pour la lignée JOK-R) ou par transfection du même vecteur vide (pour la lignée JOK-E). Ce vecteur portant une cassette de résistance à l'hygromycine B pour la sélection des cellules transfectées, ces lignées sont cultivées dans le milieu RPMI 1640 complet et en présence de 150 µg/mL d'hygromycine B (Invitrogen®).

La lignée d'endothélium microvasculaire HMEC-1 est cultivée dans du milieu Medium 131 (Gibco), complété par 5% de solution MVGS (*Microvascular Growth Factor*, Gibco), 100 U/mL de Pénicilline et 100 µg/mL de Streptomycine, sur support tapissé par de l'*Attachement Factor* (Gibco).

La lignée de stroma médullaire HS-5 est entretenue dans du milieu DMEM complété par 10 % de SVF décomplémenté, 100 U/mL de Pénicilline et 100µg/mL de Streptomycine. L'ensemble de la culture est réalisé dans une étuve à 37°C, sous une atmosphère à 5% de CO₂ et 70 % d'humidité.

L'authentification de ces lignées cellulaires a été réalisée par analyse du caryotype (pour JOK-1, EH/K, Eskol et Hair-M) et des profils STR (pour HC-1) (cf. **Annexe 6**).

2. Réactifs

L'inhibition de la synthèse des ARN est effectuée grâce à l'actinomycine D (Sigma Aldrich® ; 10 µg/mL). La prolifération des cellules a été mesurée après une incubation avec de l'IgM (Invitrogen®, 20 ou 50 µg/mL) ou du LPS (Sigma Aldrich ; 50 ou 100 ng/mL). L'induction de l'apoptose a également été effectuée par l'IFN-α (ROFERON-A®, Roche® ; 1000UI/mL) ou de TNF-α (Miltenyi Biotech®, Premium Grade ; 2 ng/mL). L'induction des

flux calciques intracellulaires a été réalisée grâce au NAD (Sigma Aldrich ; 100 μ M, concentration finale) ou par la ionomycine (Sigma Aldrich ; 0,5 ng/mL).

3. Transfections

La transfection de l'ensemble des cellules utilisées dans nos études a été réalisée par électroporation (Technique de Nucleofection[®] utilisant l'électroporateur Amaxa 2D[®] de Lonza Ltd[®]). Une quantité de 3 à 5 millions de cellules en phase exponentielle de croissance est prélevée et centrifugée à 90 g, 10 min. Le surnageant est enlevé et les culots cellulaires secs sont repris dans 100 μ L de solution de transfection (solution C pour les lignées JOK-1, JOK-E, JOK-R et EH ; solution L pour la lignée HC-1). La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un aliquot de 5 μ g de plasmide en solution aqueuse (5 μ L au maximum). Une fois homogénéisée, la solution est transférée dans une cuvette à électroporation, puis soumise à un choc électrique sur l'électroporateur selon les programmes suivants : programme Z-1 pour JOK-1, A-30 pour HC-1. Les cellules sont ensuite reprises dans 5 mL de leur milieu complet et mises à l'étuve.

4. Invalidation du gène CD38 par la technique des Zinc Finger Nucleases (ZFNs)

Afin d'étudier le rôle de la protéine CD38 dans la progression tumorale de l'HCL, nous avons utilisé une technique de *genome editing* sur le gène *CD38* mettant en jeu les ZFNs, technologie commercialisée par la société Sigma-Aldrich. Nous avons utilisé le kit *CompoZR Knockout Zinc Finger Nuclease* (CKOZFN5725).

Cette technique a été employée sur les lignées cellulaires JOK-1 et HC-1 (exprimant fortement la protéine CD38) et consiste dans un premier temps en la transfection de 2,5 μ g des 2 plasmides codant pour des ZFNs ciblant spécifiquement l'exon 1 du gène *CD38* (cf. **Annexe 1.B**). 72h après la transfection, une fois la cassure double brin induite par les ZFNs sur le gène *CD38* et la réparation non homologue effectuée, le mélange de cellules CD38⁺ et CD38⁻ est trié grâce à un trieur FACS Aria[®] (Becton Dickinson). Le module d'*autocloning* permet d'isoler des clones en plaque 96 puits, dans du milieu conditionné durant 24h provenant de la culture de la lignée parentale, filtré sur membrane 40 μ m. Après vérification au microscope de la présence d'une seule cellule par puits, les clones sont amplifiés. Chaque clone CD38⁺ et CD38⁻ est ensuite validé par séquençage nucléotidique Sanger (société GATC

Biotech[®], analyse grâce au logiciel Chromas[®] version 1.43), Western blot et cytométrie en flux. Les mélanges de clones formant les « pools » cellulaires JOK-WT et JOK-KO sont réalisés en mélangeant 1.10^6 cellules de chacun des 6 clones CD38⁺ et de chacun des 6 clones CD38⁻ sélectionnés.

5. Cytométrie en flux

500 000 cellules sont centrifugées à 180 rpm, 5 min afin d'éliminer le surnageant et lavées par 1mL de D-PBS (Gibco[®]). Le culot cellulaire est repris par 100 µL de D-PBS, auxquels est ajouté l'anticorps d'intérêt ou l'isotype correspondant, selon les proportions définies dans le **Tableau n°16** :

Anticorps (clone, fournisseur)	Dilution	Fluorochrome
Anti-CD38 (IB6, Miltenyi Biotec)	1/100 ^e	FITC
Isotype IgG2a (Miltenyi Biotec)		
Anti-CD19 (LT19, Miltenyi Biotec)	1/30 ^e	PE
Isotype IgG1 (Miltenyi Biotec)		
Anti-CD31 (AC128, Miltenyi Biotec)	1/10 ^e	APC
Isotype IgG1 (Miltenyi Biotec)		
Anti-CD45 humain (30-F11, Biolegend [®])	1/30 ^e	APC
Isotype IgG1κ (Biolegend)		
Anti-CD45 murin (HI50, Biolegend)	1/100 ^e	FITC
Isotype IgG1κ (Biolegend)		

Tableau n° 16: Récapitulatif des anticorps pour la cytométrie en flux. La concentration des anticorps n'étant pas toujours donnée par le fournisseur, nous avons indiqué la dilution à utiliser.

Le mélange est incubé 20 min à 4°C, dans l'obscurité puis lavé au D-PBS. Les échantillons sont analysés grâce à un cytofluorimètre CyAn ADP (Beckman Coulter[®]). L'analyse des données est réalisée grâce au logiciel Summit 4.3 (Beckman Coulter). Les anticorps utilisés sont dirigés contre des épitopes humains et produits chez la souris (sauf l'anticorps anti-CD45 murin, qui est produit chez le rat).

II. Techniques de biologie moléculaire

1. PCR

a. Extraction des ARN totaux

Des culots cellulaires de cinq millions de cellules maximum sont obtenus après centrifugation à 180 rpm, 5 min, et lavage au PBS (Gibco). Les cellules sont lysées et les ARN totaux sont extraits selon le protocole du kit « *High Pure RNA Extraction Kit* » (Roche Diagnostics®), comportant un traitement à la DNase I permettant d'éliminer l'ADN contaminant. Ils sont élués dans 50 µL de tampon d'élution et dosés par spectrométrie UV (Nanodrop 1000, Thermo Scientifique®). Ces ARN sont précipités par ajout de 1/10^e de volume d'acétate de sodium 3M et de 2,5 volumes d'éthanol absolu puis conservés à -80°C.

b. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

La quantification des ARN par Q-RT-PCR nécessite la synthèse d'ADNc par rétrotranscription. 5 µg d'ARN sont centrifugés à 2000 g pendant 30 min. Les culots sont repris dans 9 µL d'H₂O stérile, auxquels est ajouté un mélange de 1 µL de dNTP (10 mM) et 2 µL d'un mélange d'oligonucléotides aléatoires (250 ng/µL), servant d'amorces à la reverse transcriptase. Les oligonucléotides sont hybridés aux ARNm 5 min à 65°C. Un nouveau mélange de 2 µL de DTT (0,1 M), 4 µL de tampon 5X *First Strand* (Invitrogen®), 1 µL d'inhibiteur de ribonucléase et 1 µL de M-MLV Reverse Transcriptase à 200 U/µL (Invitrogen®) est ajouté. Les ARN sont rétrotranscrits par incubation 50 min à 37°C puis 15 min à 75°C. La réaction est arrêtée sur glace. 80 µL d'eau stérile sont ajoutés aux ADNc pour obtenir une concentration de 50 ng/µL. Les échantillons sont conservés à 4°C. Les ADNc non nouvellement synthétisés et utilisés pour notre étude proviennent de la banque d'ADNc de notre laboratoire, où les matrices sont conservées à -80°C.

c. qRT-PCR

i. *Chimie Taqman*

Nous utilisons pour mesurer les transcrits du gène *CD38* la méthode de quantification par chimie Taqman. L'analyse est effectuée en plaque 96 puits. Chaque puits comporte 10 µL d'*Universal Taqman Master Mix* (2X), 1 µL de *Taqman CD38 Gene Expression Assay*

(Applied Biosystems®) contenant la sonde FAM-MGB spécifique du gène *CD38* et les amorces amplifiant ce gène, 4 µL d'ADNc (à 25 ng/µL) qsp 20 µL H₂O stérile « *RNase/DNase free* ». Les gènes de référence utilisés sont, selon les cas, *ABL* ou *GAPDH*. L'ARNm *GAPDH* est détecté de la même manière que l'ARNm *CD38*, grâce au *GAPDH Gene Expression Assay*. Pour la quantification d'*ABL*, chaque puits comporte 10 µL d'*Universal Taqman Master Mix* (Applied Biosystems) contenant le tampon de réaction et la Taq Polymérase, 0,6 µL de chaque amorce (à 10 µM, **Annexe 2**), 0,3 µL de sonde s'hybridant spécifiquement sur l'ADNc *ABL* (à 20 µM, sonde MGB, fluorochrome FAM, séquence 6-FAM-CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-MGB), 4 µL d'ADNc (25 ng/µL) qsp 20 µL H₂O stérile « *RNase/DNase free* ». Chaque matrice est analysée en double sur chaque plaque, avec 2 puits témoins ne contenant pas d'ADNc et 2 puits contenant une matrice d'ADNc de référence, servant à normaliser les résultats d'une plaque à une autre. Chaque matrice est analysée 3 fois. L'ADNc de la lignée cellulaire HC-1, présentant un taux élevé de transcrits *CD38*, est utilisé pour réaliser une droite d'étalonnage, par dilutions successives au 1/10^{ème} de 5 points. Pour chaque plaque, cette droite d'étalonnage est générée pour l'expression du gène de référence et du gène cible et est utilisée pour déterminer l'efficacité de PCR (coefficient de détermination R² de la droite d'étalonnage de formule $a \times Ct + b$). L'expression des transcrits (ARNmq) est déterminée par l'équation : $ARNmq = 1/10^{[(Ct-b)/a]}$. Les échantillons sont amplifiés durant 50 cycles sur un analyseur *7900HT Fast real Time PCR system* (Applied Biosystems). Les données sont analysées grâce au logiciel SDS 2.4 (Applied Biosystems). Le Ct (*cycle at threshold*) correspond à la valeur de cycles à laquelle le signal de la sonde sort du bruit de fond.

ii. Chimie SYBr Green

La quantification de l'expression du gène *SMADI* est réalisée par chimie SYBr Green. Egalement réalisée en plaque 96 puits, chaque puits comporte 10 µL de *Super Mix SYBr Green* (Applied Biosystems), 0,6 µL de chaque amorce (à 10 µM, **Annexe 2**), 4 µL d'ADNc (25 ng/µL) qsp 20 µL H₂O stérile « *RNase/DNase free* ». L'analyse est réalisée de la même manière sur le même appareil et le même logiciel. Pour vérifier la spécificité d'amplification de la méthode, une courbe de dissociation est réalisée par décroissance thermique de 95°C à 60°C, afin d'observer la présence d'un pic unique prouvant la présence d'un seul ampligène.

2. Clonage du promoteur du gène CD38

Afin de savoir si la surexpression du gène *RHOH* dans la lignée JOK-R agit spécifiquement sur l'expression transcriptionnelle de *CD38*, nous étudions l'activité du promoteur de ce gène, par clonage dans un vecteur « rapporteur » : pGL4.14 [*Luc2/Hygro*] (portant le gène de la luciférase de la luciole *Photinus Pyralis*, cf. **Annexe 1.C**) et transfection dans les lignées JOK-E et JOK-R afin de mesurer l'activité luciférase.

A cette fin, nous avons cloné 4 fragments d'ADN de longueur différente dans ce plasmide (cf. **Figure 17**). Pour les fragments S, M et L du promoteur du gène *CD38*, nous avons choisi d'effectuer un sous-clonage, en vecteur pCR2.1-TOPO (cf. **Annexe 1.D**), des produits de PCR obtenus à partir d'ADNg de lignées HCL, correspondant à ces fragments. Ce sous-clonage permet le pré-criblage d'une banque de clones bactériens afin de détecter un clone contenant le fragment correctement orienté dans ce plasmide et non muté, puis d'amplifier ce plasmide en « maxi-prep » bactérienne afin d'obtenir une grande quantité du fragment d'intérêt, directement clonable de manière dirigée dans le vecteur pGL4.14. Pour le fragment RA, plus complexe à obtenir car nécessitant la jonction de fragments du gène *CD38* non contigus, la technique de clonage *InFusion* (Clontech®) a été utilisée.

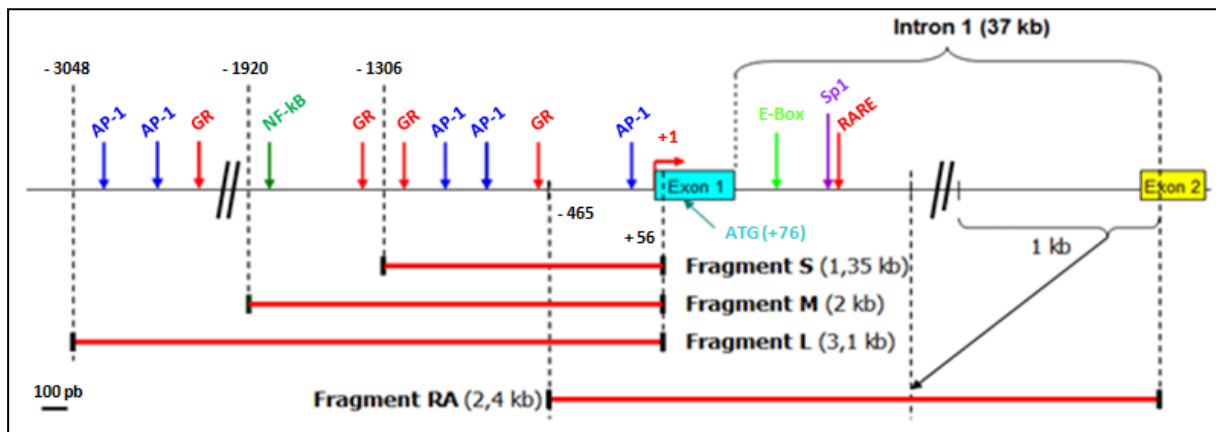


Figure 17 : Schéma explicatif des différentes constructions du promoteur du gène *CD38*. Les flèches verticales descendantes indiquent des sites de fixation (potentiels ou avérés) de facteurs de transcription. La flèche rouge identifiée « +1 » marque le site d'initiation de la transcription. Le fragment RA est une fusion de la région [-465 à +911] avec la fin de l'intron 1 et le début de l'exon 2.

a. Clonage dans le vecteur pCR2.1-TOPO

i. Amplification et purification des fragments d'ADN

Les fragments S, M et L sont amplifiés par PCR sur ADN génomique grâce à des couples d'amorces spécifiques (cf. **Annexe 2**, amorces sens : CD38S-S, CD38M-S et CD38L-S et une amorce anti-sens commune : CD38-AS) (40 cycles). L'amplification est réalisée à l'aide d'une Taq Polymérase *High Fidelity* (Life Technologies) diminuant le risque de génération de mutations. Les amplicons sont purifiés grâce au kit « *QUIA Quick PCR product Purification* » (QIAGEN®), élués par 30 à 50 µL d'H₂O puis dosés au spectrophotomètre d'absorption UV *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific).

ii. Ligature des fragments d'ADN dans le vecteur pCR2.1-TOPO

Les fragments d'ADN sont ligaturés dans le plasmide pCR2.1-TOPO grâce au kit « *TOPO TA cloning* » (Lifetechnologies). Le mélange de ligature est constitué d'1 µL d'ampligène et 1 µL de plasmide (à une concentration permettant de respecter un ratio d'une mole de PCR2.1-TOPO pour trois moles d'ampligène), 1 µL de solution saline (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂, augmentant les rendements de ligature), et 3 µL d'eau stérile. Le tout est incubé 5 min à TA et la ligature est arrêtée sur glace.

iii. Transformation bactérienne

Suite à cette ligature, les plasmides sont introduits dans des bactéries *TOPO 10 F'* (Life technologies) par mise en contact de 100 µL de mélange bactérien (préalablement décongelé sur glace) avec 2 µL de produit de ligature. Les bactéries sont incubées sur glace pendant 30 min, rendues compétentes par choc thermique (30 sec à 42°C) puis cultivées dans 250 µL de milieu SOC 1 h à 37°C, sous agitation. 50 µL de milieu sont ensuite étalés sur boîte de Petri contenant du milieu LB/Agar auquel a été ajouté de l'X-Gal (0,08 mg/mL), de l'IPTG (0,4 mM) et de l'ampicilline (50 µg/mL), afin de sélectionner les clones bactériens ayant intégré le plasmide contenant le fragment d'ADN d'intérêt, grâce au test d' α -complémentation à la β -galactosidase. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

iv. Vérification du sens d'insertion des fragments clonés et amplification du plasmide

Le plasmide et le fragment d'ADN comportent des extrémités « franches », permettant une insertion du fragment en sens ou en antisens : il est donc nécessaire de vérifier le sens d'insertion du fragment et sa taille, grâce à une technique d'extraction rapide de l'ADN par *boiling*. Chaque clone positif est inoculé dans 10 mL de milieu LB/Amp (0,08 mg/mL) et incubé une nuit à 37°C sous agitation. 3 mL de milieu de culture sont ensuite centrifugés 3 min à 1600 g ; les culots bactériens sont lysés par 50 µL de lysosyme de poule (Sigma) à 10 mg/mL (préparé extemporanément) dans 300 µL de tampon de « *boiling* » (sucrose 0,8%, Triton 0,5%, EDTA 50 mM, Tris 10 mM) mis à bouillir 1 min 30 sec à 95°C. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation, 10 min à 2000 g. L'ADN plasmidique du surnageant est précipité par 60 µL d'AcONa à 2 M et 400 µL d'isopropanol, centrifugé 15 min à 2000 g, puis solubilisé dans 50 µL d'eau stérile. Le plasmide est ensuite digéré 1 h à 37°C par une enzyme de restriction spécifique pour chaque fragment (*Pst*I pour le fragment S, *Xba*I pour le fragment M, *Bam*HI pour le fragment L), afin de générer des produits de digestion dont la longueur nous renseigne sur le sens d'insertion (cf. **Figure 18**). Le mélange réactionnel est constitué de 11 µL d'eau stérile, 2 µL de tampon 10X pour l'enzyme de restriction, 1 µL d'enzyme, 1 µL de Rnase A et 5 µL de solution de plasmide à 1 µg/µL. Les produits de digestion sont analysés par migration sur gel d'agarose à 1,5%.

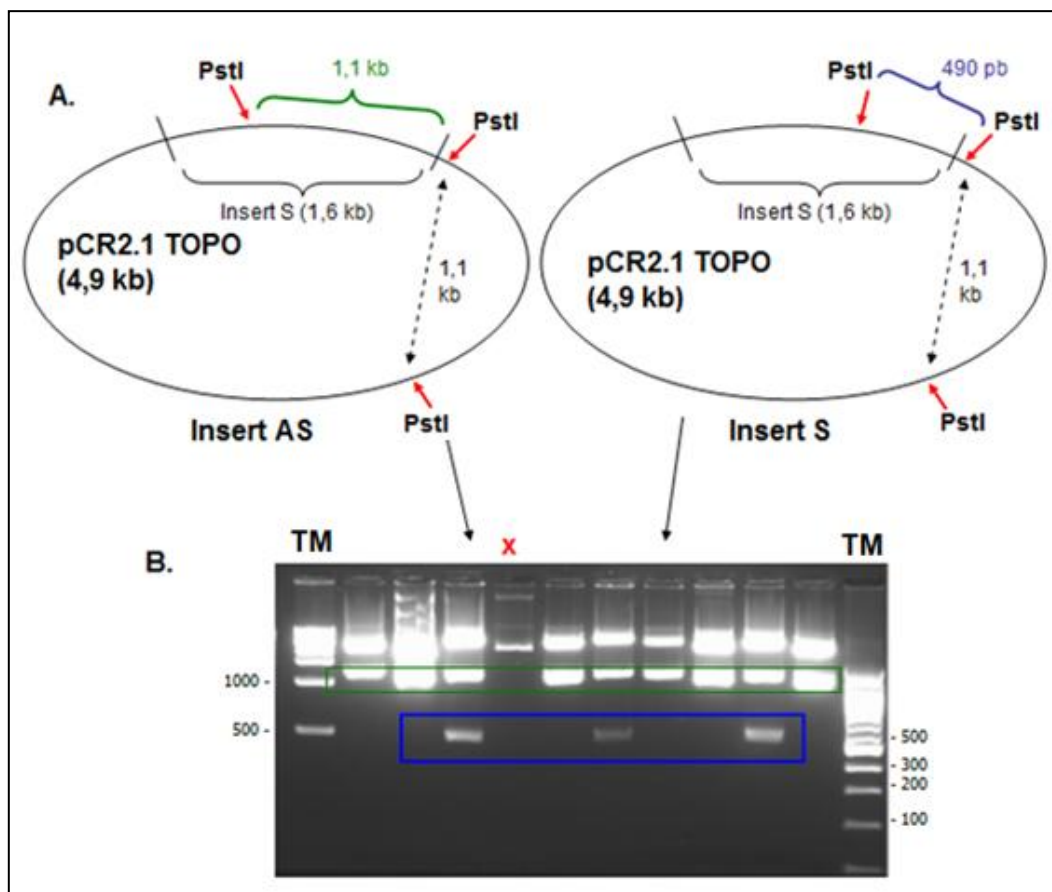


Figure 18 : Détermination du sens d'insertion du fragment S. L'introduction du fragment S induit la présence d'un nouveau site de restriction *PstI* [A]. Si l'insert est en sens (S), un fragment de digestion par l'enzyme *PstI* de 490 pb est généré, s'il est en anti-sens (AS), le nouveau fragment a une taille de 1,1 kb. La distinction entre les clones S et AS est alors possible sur gel d'agarose [B]. Exemple de gel d'agarose à 1,5%. **X** : clone comportant un plasmide n'ayant pas intégré le fragment d'ADN, le cadre bleu indique les bandes de digestion correspondant à un clone avec fragment d'ADN orienté en antisens (bande surnuméraire de 490 pb), le cadre vert indique les bandes de digestion correspondant à un clone avec fragment d'ADN orienté en sens (bande attendue de 1,1 kb). Les tailles des marqueurs de poids moléculaire (**TM**) sont exprimées en paires de bases (pb).

Une fois le sens d'insertion et la taille des fragments confirmés, les plasmides d'intérêt sont isolés à partir de ces mêmes cultures grâce au kit « *Plasmid Purification Miniprep* » (Macherey Nagel®). La solution d'ADN plasmidique est dosée au spectrophotomètre d'absorption UV Nanodrop 1000.

v. Amplification du plasmide et isolement des fragments d'ADN

Afin d'obtenir de grandes quantités des plasmides contenant les fragments de promoteur correctement orientés et non mutés, une transformation de bactéries *Z-competent DH5α* (Zymo Research®) est réalisée, par incubation de 2,5 µL de plasmide purifié à 200 ng/µL avec 100 µL de bactéries pendant 5 min, puis un étalement sur boîte de Petri LB/agar/Amp. Après

une nuit à 37°C, une miniculture est réalisée sur un des clones (8 h à 37°C sous agitation). 5 mL de cette culture sont ensuite inoculés dans 250 mL de LB/Amp afin de réaliser une « maxiculture », incubée une nuit à 37°C sous agitation. L'ADN plasmidique est alors purifié grâce au kit « *Nucleobond Xtra maxi* » (Macherey Nagel). 10 µg de plasmide purifié sont digérés par 50 U de *KpnI* et 50 U d'*EcoRV* (Biolabs®), 1 h 30 min à 37°C. Les produits de digestion sont résolus sur gel d'agarose à 1%. Le gel est placé sous lampe UV et les « bandes » correspondant aux fragments d'ADN (1,4 kb et 2 kb) sont excisées à l'aide d'un scalpel. L'ADN est alors purifié grâce au kit « *PCR and Gel Extraction Kit* » (Macherey Nagel) puis dosé grâce au spectrophotomètre Nanodrop 1000.

b. Clonage des fragments de promoteur dans le vecteur pGL4.14 [Luc2/Hygro]

i. Préparation du vecteur : linéarisation et déphosphorylation

10 µg de vecteur sont digérés 1 h 30 min à 37°C par 50 U de *KpnI* et *EcoRV* (Biolabs®) afin de le linéariser et de permettre un clonage dirigé des fragments d'ADN. Un second traitement par la phosphatase alcaline (1 U/µL, Fermentas®) 1 h 30 min à 37°C permet d'éviter le risque de religature du vecteur sur lui-même, en le déphosphorylant. Le plasmide est ensuite purifié par un traitement au phénol/chloroforme, puis précipité et repris dans un volume adéquat de tampon TE 1X (Tris-EDTA).

ii. Ligature entre pGL4.14 et les fragments du promoteur du CD38

La ligature est réalisée en présence de T4 ADN ligase (1 U/µL, Lifetechnologies), en respectant un ratio molaire pGL4.14/fragment d'ADN de 1 / 3. Ce mélange réactionnel, en présence de 2 µL de tampon pour la T4 ADN ligase (Biolabs®), est incubé 1 h à température ambiante ou 1 nuit à 4°C dans un volume final de 20 µL.

Les produits de ligature sont ensuite introduits dans des bactéries *DH5α*, les sens d'insertion vérifiés après préparation rapide d'ADN par « *boiling* » et les plasmides recombinants amplifiés et purifiés comme précédemment décrit. Nous obtenons ainsi les 3 plasmides recombinants d'intérêt : pGL4-CD38S, pGL4-CD38M et pGL4-CD38L, contenant les séquences promotrices du gène *CD38*, dont l'activité sera déterminée par mesure de l'activité enzymatique de la luciférase.

iii. Vérification par séquençage nucléotidique de l'absence de mutation dans les fragments d'ADN insérés dans les plasmides recombinants

30 µL d'une solution à 30-100 ng/µL de chaque plasmide recombinant d'intérêt sont envoyés pour séquençage nucléotidique à la société allemande GATC Biotech. Le séquençage est réalisé grâce aux amorces M13-FP (5'-TGTAACGACGGCCAGT -3') et M13-RP (5'-CAGGAAACAGCTATGACC -3'), pour le plasmide pCR2.1-TOPO et les amorces pGL3S (5'-AGTGCAGGTGCCAGAACATT -3') et pGL3AS (5'-TCCATGGTGGCTTTACCAAC-3') pour le plasmide pGL4.14 [*Luc2/Hygro*]. Ces amorces encadrent le site multiple de clonage de chaque plasmide. Les données de séquençage étant fiables sur 1000 paires de bases, un séquençage utilisant l'amorce CD38S est nécessaire pour obtenir la séquence complète des clones « M » et « L ». On obtient ainsi la séquence des plasmides pGL4.14 [*Luc2/Hygro*]/CD38S, pGL4.14 [*Luc2/Hygro*]/CD38M et pGL4.14 [*Luc2/Hygro*]/CD38L.

c. Clonage du fragment CD38-RA

Afin d'étudier l'influence de l'élément RARE (*Retinoic Acid Response Element*) présent dans l'intron 1 du gène *CD38*, nous avons réalisé une construction fusionnant une partie de la région 5' génomique, avec l'exon 1 et le début de l'intron 1 avec la fin de l'intron 1 et le début de l'exon 2 du gène *CD38*. Cette construction a été nommée « Fragment RA » (cf. **Figure 17**). En effet, afin de ne pas risquer de perdre le signal luciférase par épissage au niveau du site donneur d'épissage de l'exon 1 du gène *CD38*, il est nécessaire d'inclure le site accepteur d'épissage de l'exon 2. Cependant, l'intron 1 de *CD38* mesurant 37 kb, il nous a fallu exclure la majeure partie de cet intron, n'en gardant que ses 2 extrémités juxtaposées. Nous avons procédé selon la stratégie décrite ci-dessous, utilisant la PCR « *long-range* » et la méthode de fusion « InFusion[®] » (Clontech[®]) (cf. **Figure 19**).

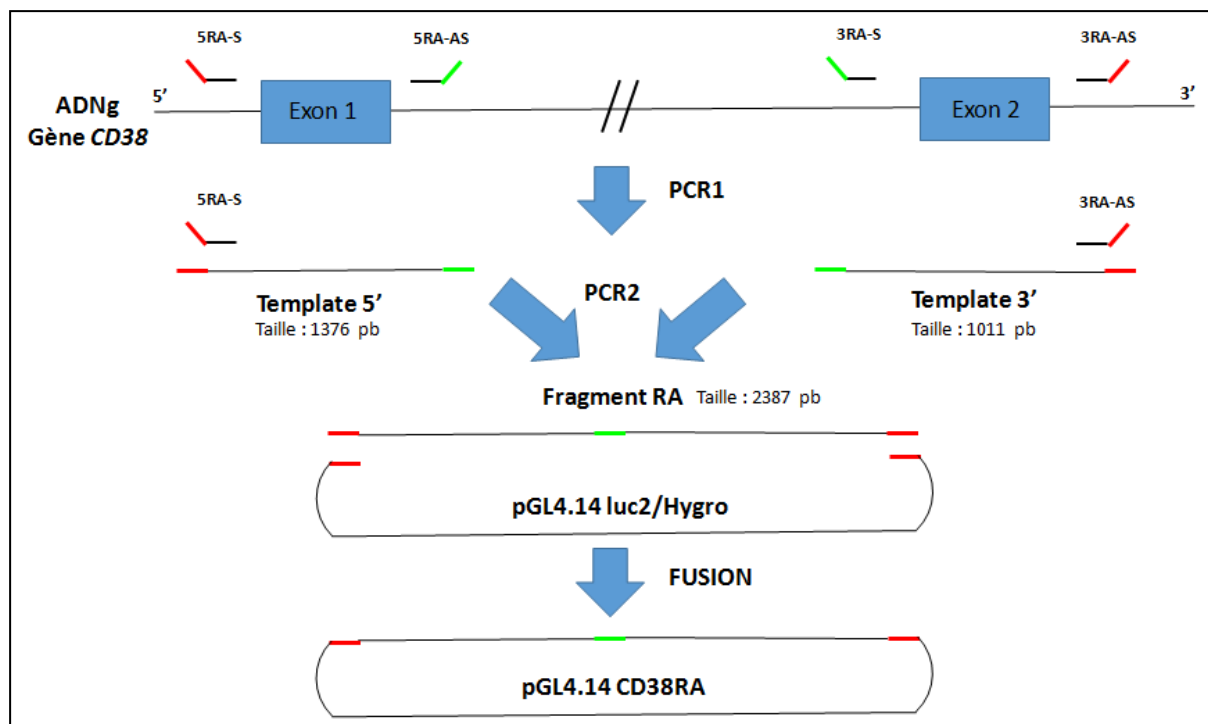


Figure 19 : Schéma de la stratégie de clonage pour la construction CD38-RA. La PCR1 permet d'amplifier les extrémités 5' et 3' du fragment RA, qui sont utilisées comme matrices pour la PCR2 générant le fragment RA. La réaction de fusion permet d'intégrer le fragment RA au plasmide rapporteur pGL4.14 [*Luc2/Hygro*]. Les séquences d'une même couleur sont complémentaires.

i. Amplification des fragments d'intérêt

2 fragments d'ADN du gène *CD38* sont amplifiés par PCR en utilisant les primers 5RA-S et 5RA-AS d'une part, 3RA-S et 3RA-AS d'autre part (cf. **Annexe 2**) et une Taq polymérase de haute fidélité (cf. **Figure 19**, PCR1). Le premier fragment de 1376 pb inclut l'extrémité 5' génomique de la construction, l'exon 1 et le début de l'intron 1 du gène *CD38* (« *Template 5'* », cf. **Figure 19**). Le second de 1011 pb comporte la fin de l'intron 1 et le début de l'exon 2 du gène *CD38* (« *Template 3'* »).

Ces produits de PCR sont ensuite purifiés par le kit « *PCR and Gel Extraction Kit* » (Macherey Nagel).

ii. PCR « long-range »

Cette étape permet de fusionner les 2 produits de PCR précédents, par l'extrémité 3' du premier et l'extrémité 5' du second. En effet, les primers 5RA-AS et 3RA-S possèdent une complémentarité qui permet, lors de l'étape d'annealing de la PCR « *long-range* », l'appariement des 2 fragments d'ADN sur ces extrémités complémentaires (cf. **Figure 19**). Cette méthode de PCR utilise donc comme matrices les 2 produits de PCR purifiés lors de

l'étape précédente (10 ng de chaque) et les amorces 5RA-S et 3RA-AS, pendant 30 cycles (cf. **Annexe 2**), toujours en utilisant une enzyme de haute fidélité, dans plusieurs mélanges réactionnels, afin d'obtenir une grande quantité du fragment de fusion de 2387 pb (PCR2). Afin d'éliminer les reliquats de fragments servant de matrices, ce long produit de PCR est déposé sur un gel d'agarose à 1% d'où le fragment de 2387 pb est excisé et purifié à l'aide du kit « *PCR and Gel Extraction Kit* » (Macherey Nagel). On obtient ainsi le fragment RA purifié.

iii. Technique de clonage « InFusion® »

Cette méthode de clonage permet de fusionner des fragments d'ADN entre eux, pour peu que ceux-ci possèdent à leurs extrémités une séquence de 15 nucléotides en commun. L'enzyme de fusion du kit « *In-Fusion HD Cloning kit* » (Clontech®) réalise une ligature des 2 fragments d'intérêt en conservant les 15 nucléotides communs. Pour notre construction, nous avons donc désigné les amorces 5RA-S et 3RA-AS pour que leurs extrémités 5' (qui correspondent donc aux extrémités 5' et 3' de notre fragment RA de 2387 pb) soient complémentaires du site multiple de clonage du vecteur pGL4.14 [*Luc2/Hygro*] digéré par l'enzyme de restriction *XhoI* (cf. **Annexe 3** et **Figure 19**). La réaction de fusion est réalisée en mélangeant 100 ng de fragment RA, 100 ng de vecteur pGL4.14 [*Luc2/Hygro*] préalablement linéarisé par *XhoI*, 2 µL du réactif « *5X In-Fusion HD Enzyme Premix* » (contenant l'enzyme de fusion et son tampon) qsp 10 µL d'eau ultra-pure. Le mélange est incubé 15 min à 50°C. 2,5 µL de ce mélange sont ensuite utilisés pour transformer des bactéries DH5α. Les clones sont ensuite criblés par digestion enzymatique pour déterminer la présence du fragment d'ADN correctement orienté dans le plasmide pGL4.14 [*Luc2/Hygro*]. Une fois ce clone identifié, il est amplifié et le plasmide purifié et séquencé comme les autres constructions du promoteur du gène *CD38* (cf. p. 67). On obtient ainsi le plasmide pGL4.14 [*Luc2/Hygro*]/CD38RA.

d. Transfection transitoire des plasmides dans les lignées cellulaires

HCL

Afin d'évaluer l'activité des constructions de promoteur du gène *CD38*, 1 µg de plasmide contrôle pRSV-βGal (vecteur d'expression de la β-galactosidase, Promega®, cf. **Annexe 1.F**) et 3,5 µg de plasmide recombinant d'intérêt sont ajoutés à la solution cellulaire de transfection (cf. p. 58), qui est transférée dans une cuvette. La transfection est réalisée

grâce à l'électroporateur Amaxa (Lonza®) réglé sur le programme précédemment mis au point. Après transfection, les cellules sont reprises dans 1,5 mL de milieu RPMI complet et incubées à 37°C. 16 h plus tard, des culots cellulaires destinés à l'extraction des protéines sont réalisés après centrifugation à 180 g, 5 min et lavage au D-PBS. Les culots sont conservés à -80°C.

La surexpression transitoire de la protéine Smad1 est réalisée par transfection de 5 µg de vecteur d'expression protéique *pENTER* (cf. **Annexe 1.E**) contenant l'ORF du gène *SMAD1*, ou du même vecteur vide (comme contrôle). La transfection est faite de la même manière qu'au paragraphe précédent. 24 h ou 48 h après transfection, les cellules sont collectées par centrifugation à 180 g, 5 min et lavage au D-PBS. Les culots sont conservés à -80°C.

L'impact de l'expression de Smad1 sur l'activité promotrice des constructions plasmidiques du promoteur du gène *CD38* est évalué par la transfection de 3 µg de plasmide *pENTER* contenant l'ORF du gène *SMAD1* ou du *pENTER* « vide », de 1,6 µg de plasmide pGL4.14 [*Luc2/Hygro*]/*CD38S* et 0,25 µg de vecteur contrôle pRL-CMV (cf. **Annexe 1.G**). 16 h après transfection, des culots cellulaires destinés à l'extraction des protéines sont réalisés après centrifugation à 180 g, 5 min et lavage au D-PBS. Les culots sont conservés à -80°C.

III. Techniques de biochimie

1. Dosage de protéines

Les culots « secs » des différentes lignées cellulaires étudiées sont lysés en présence de tampon M-PER (Pierce®) et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases B et C (Santa Cruz®). La concentration en protéines des lysats est déterminée par mesure de l'absorbance à 562 nm grâce au dosage BCA (Pierce), basé sur la réduction des ions Cu^{2+} en ions Cu^{+} en milieu alcalin. Les ions Cu^{+} chélatent 2 molécules d'acide bicinchonique (BCA), formant un complexe violet absorbant à 562 nm. Les valeurs d'absorbance sont ensuite reportées sur une droite étalon (obtenue par des mesures réalisées sur des solutions de concentration croissante en serum albumine bovine).

2. Western Blot

La séparation des protéines est réalisée sur gel de polyacrylamide Bis-Tris 4-12% (minigel « précoulé » Lifetechnologies) dans un tampon de migration MES (Invitrogen), durant environ 1 h à 200 mV. Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de nylon grâce au système de transfert sec « *Iblot* » (Lifetechnologies) durant 7 min. Les sites de fixation non spécifiques sont ensuite saturés 1 h 30 min à température ambiante dans un tampon contenant 5% de lait écrémé (Santa Cruz), 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,2% Tween 20. Les anticorps primaires sont hybridés sur la membrane dans le même tampon de blocage (cf. **Tableau n° 20** ci-dessous pour les concentrations en lait ou de BSA correspondant à chaque anticorps primaire), pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, la membrane est lavée trois fois 10 min par du TBS-Tween 1%. L'hybridation de l'anticorps secondaire couplé à la HRP (dilution 1/5000^e, Cell Signalling[®] pour toutes les espèces) est faite 1 h à température ambiante, dans le même tampon que pour l'anticorps primaire. Après trois lavages de 10 min au TBS-Tween 0,2%, nous utilisons la chimioluminescence et le réactif « *ECLPrime* » (Amersham[®]) pour révéler les protéines d'intérêt et le réactif « *Western Pico* » (Pierce) pour les témoins de charge (anti- β -actine, anti-GAPDH ou anti-HSC70). Après 5 min d'incubation à température ambiante dans le noir, la révélation des bandes est effectuée sur un scanner « *LAS4000* » (GEHealthCare[®]). L'analyse des images est réalisée grâce au logiciel « *MultiGauge* » version 3.0 (Fuji[®]).

L'ensemble des anticorps primaires utilisés dans nos études est listé ci-dessous (cf. **Tableau n°20**):

Cible	Mono- ou polyclonal ?	Anticorps secondaire	Dilution	% en protéine saturante dans le tampon	Fournisseur
CD38	mono	Souris	1/250 ^e	Lait 5%	BDPharmingen
HuR	poly	Lapin	1/1000 ^e	Lait 5%	Millipore
TTP	poly	Lapin	1/1000 ^e	Lait 5%	Millipore
AUF-1	poly	Chèvre	1/10000 ^e	Lait 5%	Santa Cruz
RhoH	poly	Lapin	1/500 ^e	Lait 5%	Covalab (Fait « maison »)
Smad1	poly	Chèvre	1/750 ^e	Lait 5%	R&D Systems
Phospho Smad1 (Ser206)	poly	Lapin	1/5000 ^e	BSA 5%	Millipore
Phospho Smad1 (Ser187)	poly	Lapin	1/500 ^e	BSA 5%	Enogene
Phospho Smad1 (Ser463-465)	poly	Lapin	1/1000 ^e	BSA 5%	Upstate
GAPDH	poly	Lapin	1/1000 ^e	Lait 5%	Santa Cruz
Lamine B	poly	Chèvre	1/1000 ^e	Lait 5%	Santa Cruz
HSC70	poly	Chèvre	1/5000 ^e	Lait 5%	Santa Cruz
β-actine	mono	Souris	1/10000 ^e	Lait 5%	Sigma Aldrich

Tableau n°20 : Récapitulatif des anticorps utilisés en Western Blot. La concentration des anticorps n'étant pas toujours donnée par le fournisseur, nous avons indiqué la dilution à utiliser.

a. Fractionnement cellulaire

Afin d'étudier la localisation sub-cellulaire de différentes protéines, un fractionnement cellulaire a été réalisé grâce à différents kits commercialisés par la société Thermo Fisher Scientific®. Le kit « *NE-PER* » a été utilisé pour produire les extraits nucléaires et cytoplasmiques, le kit « *MEM-PER* » a été utilisé pour les extraits membranaires.

Pour le kit « *NE-PER* », des culots cellulaires secs de $20 \cdot 10^6$ cellules sont resuspendus dans 200 μ L de tampon CER I, vortexés vigoureusement pendant 15 sec et incubés 10 min sur glace. 11 μ L de tampon CER II sont ensuite ajoutés. Le mélange est vortexé 5 sec et incubé 1 min sur glace. Il est de nouveau vortexé 5 sec et centrifugé 5 min à 16 000 g. Le surnageant, correspondant à la fraction cytoplasmique, est récupéré et conservé à -80°C . Le culot, contenant les noyaux, est lavé par 50 μ L de tampon CER I, centrifugé quelques sec à vitesse maximum pour faire sédimenter les noyaux, puis le surnageant est éliminé. Cette opération est réalisée 5 fois afin d'éliminer un maximum de contamination cytoplasmique de la fraction nucléaire. Le culot est ensuite resuspendu dans 100 μ L de tampon NER, vortexé vigoureusement pendant 5 sec et incubé sur glace pendant 40 min en vortexant 15 sec toutes les 10 min. Le mélange est ensuite centrifugé à 16 000 g pendant 10 min. Le surnageant, constituant la fraction nucléaire, est récupéré et conservé à -80°C .

Pour le kit « *MEM-PER* », des culots cellulaires secs de $20 \cdot 10^6$ cellules sont resuspendus dans 150 μ L de réactif A, puis les solutions sont homogénéisées et incubées 10 min à température ambiante en vortexant toutes les 2 min. Les lysats sont conservés sur glace. 450 μ L d'un mélange glacé réactif C / réactif B en proportion 2 / 1 sont ajoutés au lysat. Le tout est incubé sur glace 30 min en vortexant toutes les 5 min, puis centrifugé 3 min à 10 000 g et à 4°C . Les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes et incubés 20 min à 37°C au bain marie, puis centrifugés 2 min à 10 000 g pour séparer les fractions aqueuses et organiques. La fraction hydrophile (celle du dessus) est enlevée précautionneusement à la pipette, et la phase organique (inférieure) contenant les protéines membranaires est conservée. Il est à noter que lors des dépôts sur le gel de Western Blot, ces phases organiques doivent être diluées entre 2 et 5 fois dans du réactif B dilué au $\frac{1}{4}$ dans de l'eau ultrapure, afin d'éviter une mauvaise migration due au solvant organique.

b. Extraction des protéines et mesure des activités luciférase et β -galactosidase par chimioluminescence

i. Contrôle β -galactosidase

Les culots cellulaires « post-transfection » des constructions du promoteur de *CD38* en vecteur rapporteur de la luciférase et du plasmide contrôle pRSV- β Gal (cf. **Annexe 1.F**) sont lysés dans 250 μ L du tampon de lyse (100 mM phosphate de potassium pH 7,8 ; 0,2% Triton X-100) auquel est ajouté extemporanément $\frac{1}{1000}^{\text{e}}$ de volume de DTT 1 M. Après 5 min d'incubation à TA, les lysats sont centrifugés 5 min à 2000 rpm puis les surnageants sont

recupérés. Les lysats sont répartis dans une plaque 96 puits : 50 µL pour la mesure de l'activité luciférase et 25 µL pour l'activité β-Gal, chaque mesure étant réalisée en duplicat. 200 µL de substrat luminescent de la β-Gal (« *β-Gal luminescent detection kit* », Clontech) sont ajoutés aux 25 µL de lysat et incubés 1 h à TA dans le noir. La luminescence ($A_{\beta\text{-Gal}}$) est mesurée sur un lecteur « *Mithras LB940* » (Berthold®). Une solution de substrat de la luciférase (25 mM Tris-phosphate, 8mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 2 mM ATP, 0,5 mM luciférine) est injectée par l'appareil dans les 50 µL de lysat et l'activité luciférase (A_{LUC}) est mesurée. Nous réalisons la moyenne des mesures des duplicats et l'activité luciférase relative (normalisée par l'activité β-Gal pour chaque mesure) est calculée comme suit :

$$A_{\text{LUCrel}} = \frac{A_{\text{LUC}}}{A_{\beta\text{-Gal}}}$$

L'activité promotrice de chaque construction est alors exprimée comme le rapport de A_{LUCrel} sur l'activité du vecteur vide.

ii. Contrôle *Renilla* Luciférase

Les culots cellulaires « post-transfection » des constructions du promoteur de *CD38* en vecteur rapporteur de la luciférase et du plasmide contrôle pRL-CMV (cf. **Annexe 1.G**) sont extraits et analysés grâce au kit « *Dual-Luciferase Reporter Assay* »® (Promega®), selon le protocole du fournisseur. Ce système permet de réaliser la mesure d'une activité luciférase « test » et d'une « contrôle » sur le même prélèvement de lysat de l'échantillon, limitant ainsi les variations dues aux manipulations. Ainsi, 20 µL de chaque échantillon (préalablement lysé dans 100 µL de tampon de lyse PLB 1X) sont mélangés à 100 µL de solution LARII contenant la luciférine. La luminescence est alors lue sur un luminomètre « *Spectramax i3* » (Molecular Devices®). Cette luminescence correspond à l'activité « test » de la luciférase de *Photinus Pyralis* (A_{FLUC}), produite par les vecteurs rapporteurs d'intérêt. 100 µL du réactif « *Stop&Glo* » va éteindre l'activité de la luciférase de *Photinus pyralis* (0,0004% d'activité résiduelle) et activer celle de *Renilla reniformis* (produite par le plasmide contrôle pRL-CMV). Une seconde lecture au luminomètre nous fournit ainsi l'activité « contrôle » de la luciférase de *Renilla reniformis* (A_{RLUC}). Chaque échantillon est analysé en duplicat, dont les moyennes nous fournissent les activités permettant de calculer l'activité luciférase relative (de la même manière qu'au paragraphe précédent) selon la formule :

$$A_{LUC_{rel}} = \frac{A_{FLUC}}{A_{RLUC}}$$

IV. Techniques de biologie fonctionnelle

a. Test d'adhérence lymphocytaire sur tapis cellulaire endothélial

Les cellules d'endothélium microvasculaire HMEC-1 sont comptées etensemencées à 30 000 cellules par puits en plaque 96 puits, de manière à former des tapis cellulaires confluents après 48 h de culture (la confluence des tapis HMEC-1 est vérifiée après 48 h sur des puits témoins, par technique de coloration au cristal violet). 16 h avant l'ajout des lymphocytes pour le test d'adhérence, les tapis cellulaires sont activés par une solution de milieu contenant 200 ng/mL de LPS (Sigma Aldrich®). Les « pools » cellulaires HCL (JOK-WT, JOK-KO) sont incubés 30 min à 37°C dans leur milieu de culture en présence de 5 µM de BCECF-AM (Molecular Probes®) et lavés 3 fois avec du tampon HBSS (Gibco). 100 000 cellules sont alors ajoutées sur les tapis endothéliaux, les plaques 96 puits sont centrifugées à 400 g pendant 4 min et les cellules leucémiques sont laissées à adhérer pendant 1 h à l'étuve de culture cellulaire à 37°C. Les tapis cellulaires endothéliaux sont ensuite précautionneusement lavés 3 fois par 200 µL de HBSS, afin d'enlever les cellules n'ayant pas adhéré de manière spécifique. L'intensité de fluorescence à 535 nm, émise par les cellules ayant adhéré, est mesurée sur un spectrofluorimètre « Spectramax i3 » (Molecular Devices®). L'ensemble des données de fluorescence est reporté sur une droite étalon, réalisée par mesure de l'intensité de fluorescence sur des dilutions successives de chaque « pool » cellulaire, afin de fournir le nombre de cellules ayant adhéré sur les tapis endothéliaux. Le nombre de cellules calculé pour chaque expérience représente une moyenne d'observations de 6 puits par condition.

b. Test de migration lymphocytaire transendothéliale

Des cellules HMEC-1 ont été ensemencées dans des chambres de migration de type « Transwells » de 6,5 mm de diamètre, possédant une membrane en polycarbonate avec des pores de 5 µM (Corning®). L'ensemencement est réalisé de la même manière que celle décrite au paragraphe précédent, afin de former des tapis cellulaires confluents après 48 h. Les

« *Transwells* » sont placés dans des plaques 24 puits, avec du Medium-131 complet (150 µL au dessus, dans la chambre et 600 µL en dessous). Les tapis HMEC-1 sont activés ou non par 200 ng/mL de LPS dans le milieu pendant 16h puis lavés avec du milieu neuf. Les cellules JOK-WT et JOK-KO sont comptées, centrifugées à 130 g 5 min et reprises dans du Medium-131 complet à une concentration de 667 000 cellules/mL. 150 µL de suspension cellulaire (correspondant à 150 000 cellules) sont ensuite déposés sur les tapis endothéliaux. Les cellules lymphoïdes sont alors laissées à sédimenter et adhérer sur l'endothélium pendant 8 h, puis 200 ng/mL de LPS sont ajoutés dans le milieu sous les « *Transwells* », afin de favoriser le chimiotactisme. Les plaques sont ensuite incubées pendant 16 h à l'étuve à 37°C, 5% de CO₂, puis les cellules ayant migré à travers les tapis endothéliaux sont comptées. Le nombre de cellules ayant migré pour chaque expérience représente une moyenne d'observation de 3 « *Transwells* » par condition.

c. *Mesure de l'apoptose*

La proportion de cellules en apoptose pour les « pools » cellulaires JOK-WT, JOK-KO, HC-1 WT et HC-1 KO est mesurée grâce au kit « *Annexin V/ IP* » (Beckman Coulter). Les cellules sont incubées pendant 24 h, 48 h ou 72 h dans du milieu RPMI complet, ou déplété en SVF, ou complété par 10% de DMSO, ou contenant 2 ng/mL de TNF- α , ou 1000 UI/mL d'IFN- α . Elles sont ensuite lavées par 1 mL de PBS glacé, puis centrifugées. Le reste des manipulations est réalisé sur glace. Les cellules sont resuspendues dans 100 µL de *Binding Buffer* 1X auxquels sont ajoutés 1 µL d'Annexine V-FITC et 5 µL d'IP, puis elles sont incubées 15 min à l'obscurité. 400 µL de *Binding Buffer* sont ensuite ajoutés dans les tubes qui sont analysés par un cytomètre « *CyAn ADP* » (Becton Dickinson). Les données sont analysées grâce au logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

d. *Mesure de la prolifération cellulaire*

Les tests de mesure des propriétés prolifératives des cellules JOK-WT, JOK-KO, HC-1 WT et HC-1 KO sont réalisées avec le kit « *Click-it[®] EdU* » (Life Technologies[®]). Les cellules sont préalablement incubées dans du milieu complet seul, ou complété par 50 µg/mL d'IgM ou 200 ng/mL de LPS pendant 24 h ou 3 h. 500 000 cellules sont centrifugées, incubées pendant 2 h dans du milieu complet avec 10 µM d'EdU puis lavées par 1 mL de PBS-BSA 1% et fixées 15 min par 100 µL de formaline. Elles sont ensuite de nouveau lavées au PBS-BSA 1% et perméabilisées 15 min par 100 µL de *Click-it Saponin-based Reagent*. 400 µL du mélange réactionnel de chimie « *click* », contenant de l'azide d'Alexa Fluor 647, sont ajoutés

et le tout incubé 30 min à l'obscurité. Après rinçage au *Saponin-based Reagent*, les cellules sont resuspendues dans 500 μL de ce même tampon, auxquels sont ajoutés 1 μg de RNase A et 4 μg d'IP, puis elles sont incubées pendant 45 min. Les échantillons sont ensuite analysés sur un cytomètre CyAn ADP, afin de générer des histogrammes biparamétriques présentant les intensités de fluorescence de l'Annexine V sur l'IP. Les cellules A^+/IP^+ sont considérées comme la fraction de cellules mortes par apoptose. Les données sont analysées grâce au logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

e. Mesure de la croissance des cultures cellulaires

Les cellules JOK-WT, JOK-KO, HC-1 WT et HC-1 KO sont inoculées à 5.10^5 cellules/mL dans du milieu complet. Toutes les 48 h, les cellules de chaque culture sont comptées et réensemencées à 5.10^5 cellules/mL. La croissance des cellules est mesurée sur 8 jours. Le nombre de cellules calculé tous les 2 jours est corrigé par le facteur de dilution issu des numérations précédentes afin d'obtenir la valeur cumulée du nombre de cellules.

f. Mesure des flux calciques intracellulaires

5.10^5 cellules/mL de chaque culture (JOK-WT, JOK-KO) sont incubées 30 min à 37°C dans 5 mL de tampon HBSS sans calcium et sans SVF, complété par 7,5 μL d'Indo-1 à 1 mM (Molecular Probes). Elles sont ensuite centrifugées et resuspendues dans 2,5 mL de tampon HBSS. Une solution de NAD (ou le même volume d'eau) est ajoutée à la suspension cellulaire, à une concentration finale de 100 μM et les cellules sont ensuite analysées sur un cytomètre LSR Fortessa X20 (Becton Dickinson). Le ratio de l'intensité de fluorescence à 450 nm sur celle à 530 nm est mesuré, et l'ensemble des données représenté sur un diagramme « dot-plot ». L'ajout de ionomycine à une concentration de 0,5 μM finale est utilisé comme témoin positif d'induction des flux calciques.

V. Manipulations *in vivo*

a. Conditions d'élevage

Les souris utilisées pour nos études appartiennent à la lignée consanguine NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (Jackson Laboratory®) et sont élevées à l'Animalerie Haute Technologie de Lille (ex-IFR114), en cages ventilées « Green Line » (Techniplast®), à raison de 2 à 6 souris du même sexe par cage afin de maintenir des interactions sociales. La litière

est composée de copeaux de peuplier, avec un enrichissement constitué d'un tube d'ouate type *Cocoon* (Anibed®). Elles disposent d'eau stérile et de nourriture Rat & Souris n°1 Entretien (SDS Special Diet Services®) fournis *ad libitum*.

b. Mesure de la croissance des tumeurs induites in vivo

L'étude de l'impact de l'expression de la protéine CD38 dans la progression tumorale de l'HCL est réalisée par injection *i*) intrapéritonéale de $10 \cdot 10^6$ cellules ou *ii*) sous-cutanée de $5 \cdot 10^6$ cellules JOK-WT ou JOK-KO, à des souris âgées de 6 à 8 semaines. Les cellules en culture sont comptées, puis centrifugées à 90 g, 10 min et $10 \cdot 10^6$ ou $5 \cdot 10^6$ cellules sont resuspendues dans 100 µL de milieu IMDM sans SVF. Suite à l'injection, la croissance des tumeurs est suivie sur une série de souris afin de déterminer à quel moment les tumeurs étaient en phase exponentielle de croissance. Elles le sont toujours à 4 semaines, période à laquelle la taille des tumeurs nécessite le sacrifice des souris. Les tumeurs sont alors disséquées, pesées puis mesurées grâce à un pied-à-coulisse électronique. Le volume des tumeurs est calculé en mm³ selon la formule d'une ellipse : $V = \frac{4 \pi \times L \times l \times e}{3}$ où « L » est la longueur de la tumeur, « l » sa largeur, « e » son épaisseur.

VI. Analyses *in silico*

a. Recherche de sites de liaison de microARNs

La recherche de sites de liaisons potentiels de miRs à l'ARNm de *CD38* a été réalisée grâce aux logiciels TargetScan® 6.2 et TarBase® (v7.0). TarBase est un logiciel de l'université de Thessalie utilisant la base de données DIANA®, et référant les publications citant les interactions de miRs avec leur cible. La référence Ensembl ENS00000004468 de l'ARNm *CD38* a été utilisée pour la recherche. TargetScan est un logiciel du *Whitehead Institute for Biomedical Research* utilisant un algorithme de prédiction de sites potentiels de liaison d'un miR à un ARNm. Il classe les sites de liaison en sites conservés ou non conservés, en utilisant un score « context+ » [228] et une probabilité de ciblage P_{CT} [229]. La séquence de l'ARNm *CD38* référencée NM_001775 par le NCBI a été utilisée et extraite de la base de données de l'*University of California Santa Cruz* (UCSC).

**b. Recherche de protéines tronquées potentiellement fonctionnelles
générées par genome editing**

Lors de la validation des clones JOK-KO présentant une expression invalidée de *CD38* après action des ZFN, nous avons entré les séquences nucléotidiques nouvellement générées à partir du codon ATG initiateur de l'ARNm *CD38* dans le logiciel ExPASy, afin de les convertir en acides aminés, et ce pour chaque clone KO-CD38. Cet outil en ligne a été développé par le *Swiss Institute of Bioinformatics*. Les séquences peptidiques ainsi générées ont ensuite été analysées grâce au logiciel de criblage BLASTp afin de les comparer à la base de données du NCBI, et de rechercher si des motifs fonctionnels avaient été créés.

RESULTATS

I. Régulation du gène *CD38* par la protéine RhoH dans l'HCL

1. Validation des données du transcriptome sur la répression du gène *CD38* par RhoH

La première étape du projet a été de confirmer que les données de puces à ARN montrant une répression des transcrits *CD38* s'accompagnaient bien d'une diminution de l'expression protéique pouvant avoir un potentiel impact fonctionnel.

A cette fin, de même que pour l'étude transcriptomique, nous avons utilisé la lignée cellulaire HCL JOK-1 exprimant de manière stable le vecteur d'expression protéique *pMEP-4* contenant le cadre ouvert de lecture du gène *RHOH* (fusionné à un tag VSVG en 5'), que nous nommerons JOK-R pour JOK-RhoH. Celle-ci a été comparée à la lignée cellulaire contrôle JOK-E (pour JOK-Empty), exprimant de manière stable le même vecteur *pMEP4* non recombiné.

Grâce à une sonde Taqman détectant l'ensemble des transcrits *CD38*, nous avons confirmé la diminution des taux d'ARNm *CD38* dans la lignée cellulaire JOK-R (cf. **Figure 21**). Cette répression des transcrits est bien associée à une diminution de l'expression de la protéine totale (cf. **Figure 22**) ainsi que de la forme transmembranaire (cf. **Figure 23**), responsable de phénomènes d'adhérence cellulaire et de transduction du signal.

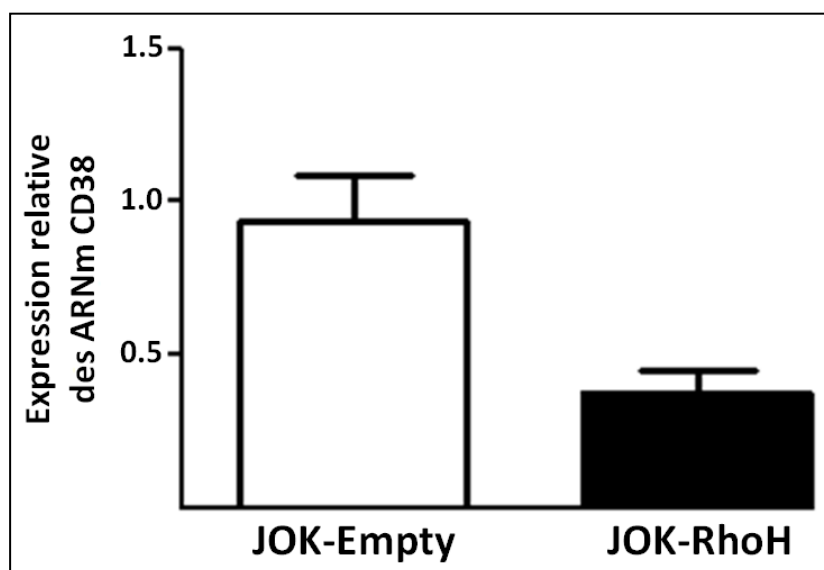


Figure 21 : Analyse en Q-RT PCR des taux d'expression des transcrits *CD38* dans les lignées JOK-E et JOK-R. L'expression du gène *CD38* a été normalisée par celle du gène *ABL* (n=4, p < 0,005).

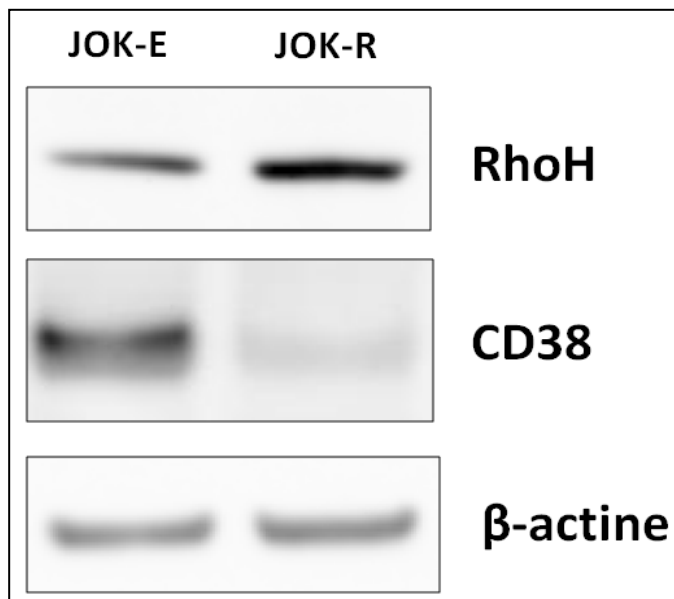


Figure 22 : Image représentative d'un Western Blot utilisant des anticorps humain anti-RhoH et anti-CD38 dans les lignées cellulaires JOK-E et JOK-R. Un anticorps anti- β -actine est utilisé comme témoin de charge.

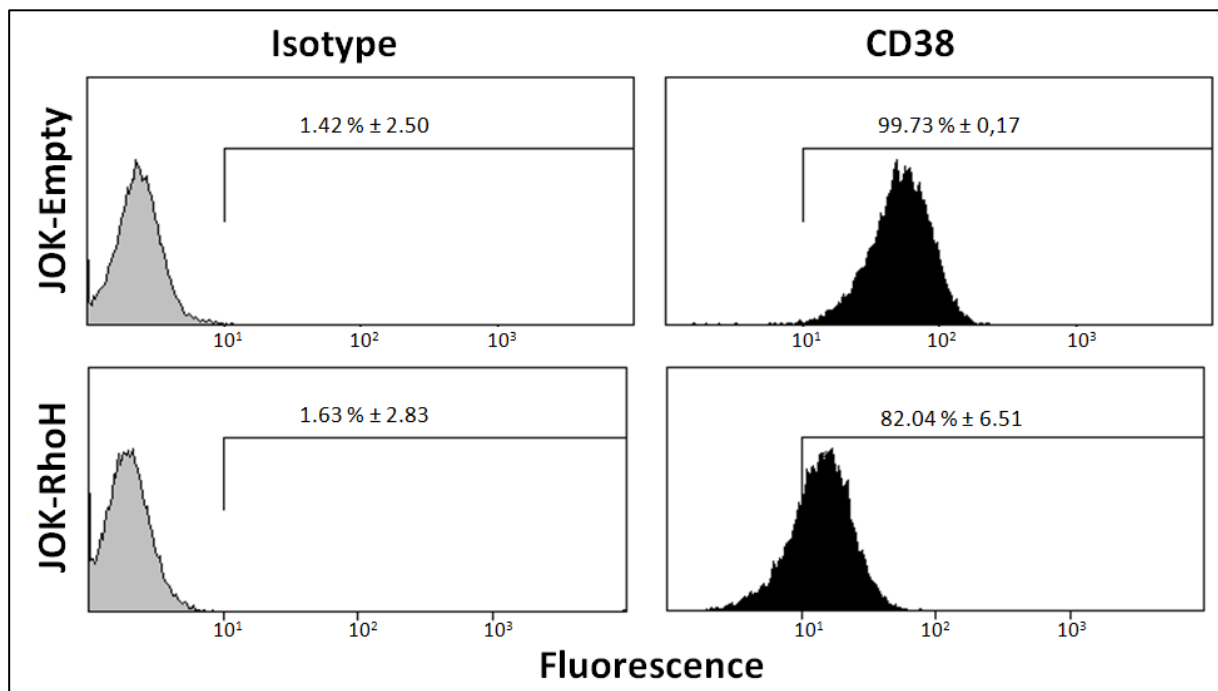


Figure 23 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression membranaire de CD38 dans les lignées cellulaires JOK-E et JOK-R. Les histogrammes en gris correspondent à l'isotype et ceux en noir correspondent à l'anticorps anti-CD38. Les chiffres au dessus des barres de régions indiquent les pourcentages de positivité \pm écart-type. La fluorescence est indiquée en échelle logarithmique.

2. Régulation de l'activité promotrice du gène *CD38* par RhoH

a. Expression des transcrits *CD38* et activité promotrice dans les lignées cellulaires *HCL*

L'expression des transcrits du gène *RHOH* est réprimée dans l'HCL [110]. Afin de savoir si une corrélation inverse entre l'expression des transcrits *RHOH* et *CD38* existe, nous avons mesuré les taux d'ARNm *CD38* dans un panel de six lignées HCL, ainsi que de six autres lignées B lymphoïdes et cinq lignées T lymphoïdes (cf. **Figure 24**). Nous avons isolé les ARNs de la plupart des lignées cellulaires HCL et avons bénéficié de la banque d'ADNc du laboratoire pour les lignées lymphoïdes B non HCL et T-lymphoïdes. Tous les ADNc ont été préparés selon le même protocole (cf. **Matériel et Méthodes p. 60**). On observe une hétérogénéité d'expression de *CD38* dans les lignées HCL étudiées : quatre d'entre elles présentent un niveau d'expression bas (EH/K, Hair-M, Bonna-12 et Eskol) et deux autres ont un niveau plus élevé (JOK-1, HC-1). De même, dans les lignées B-lymphoïdes non HCL, cette expression est hétérogène : très forte dans la lignée de lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) Val, faible ou nulle dans les lignées Reh (lymphoblaste) et Mec-1 (LLC) respectivement, et notable dans 3 lignées de lymphome de Burkitt (Raji, Daudi et BL-2). Dans les lignées T-lymphoïdes, le taux d'ARNm *CD38* est faible (HSB2, CEM, Jurkat) voir nul (Mo, 1301).

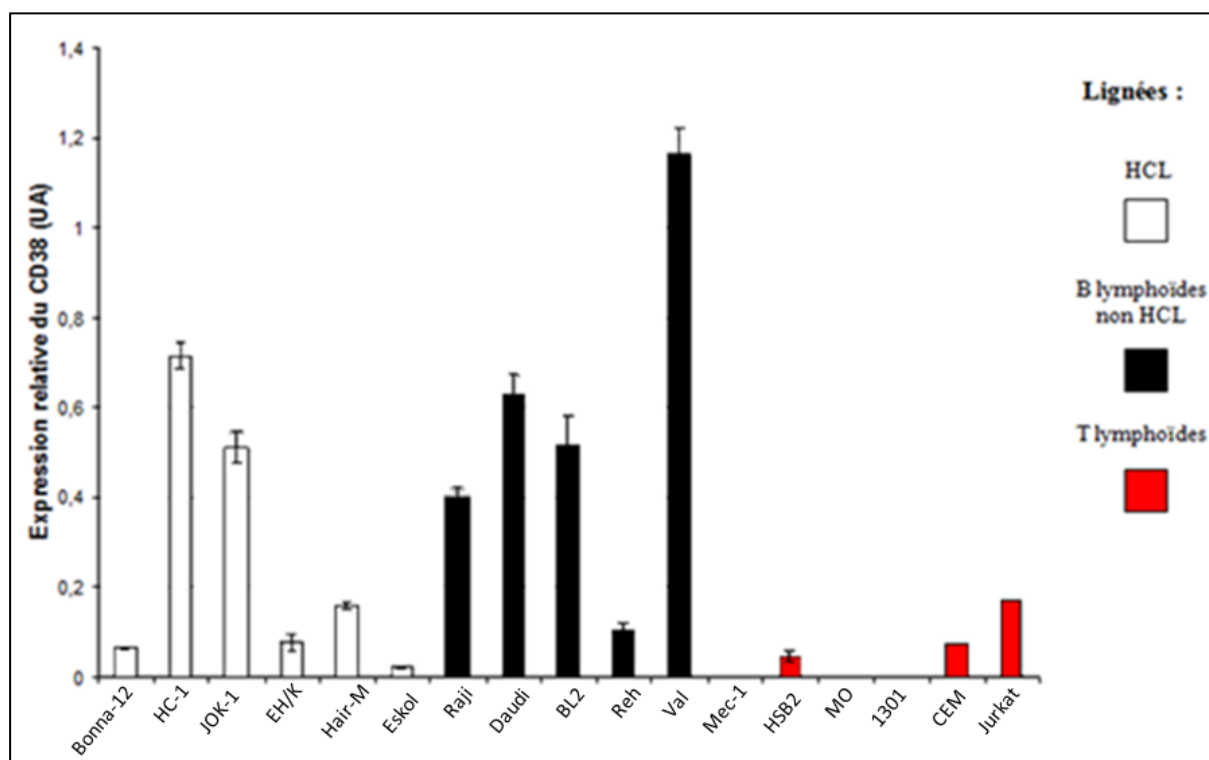


Figure 24 : Comparaison de l'expression relative du gène *CD38* entre les lignées HCL et d'autres lignées lymphoïdes B non HCL et T. Les barres d'erreur représentent l'écart-type, un à deux ADNc ont été mesurés pour chaque lignée, trois fois, en duplicat. L'expression du gène *CD38* a été normalisée par celle du gène *ABL*. UA : unité arbitraire.

b. Rationnel du choix des constructions de promoteur produites

Nous avons ensuite cherché à comprendre le mécanisme de régulation de l'expression du gène *CD38* par RhoH. La littérature, bien documentée sur la régulation transcriptionnelle de *CD38*, (cf. **Introduction p. 35 à 37**) ainsi que la capacité de RhoH à interférer avec des voies de signalisation impliquées dans la régulation de ce gène (telles p38 ou NF- κ B, cf. p. 32), nous ont incité à privilégier dans un premier temps l'étude de l'activité promotrice du gène *CD38*. Nous avons donc réalisé des constructions de fragments de ce promoteur en vecteur rapporteur de la luciférase pGL4.14 [*Luc2/Hygro*] (cf. **Figure 25**). Trois de ces constructions comprennent la partie 5' génomique de *CD38*, possédant notamment des sites de fixation pour les facteurs AP-1 et NF- κ B modulant l'activité de ce gène [132]–[134]. Il s'agit des constructions S, M et L (respectivement débutant aux nucléotides -1306, -1920 et -3048, par rapport au site [+1] d'initiation de la transcription). Nous avons également réalisé une 4^{ème} construction, le fragment RA, afin d'étudier l'influence des éléments de réponse situés au début de l'intron 1 du gène *CD38*. La « E-Box » et l'élément RARE situés dans cette région ont notamment été montrés comme ayant une influence sur l'expression du gène *CD38* dans les cellules hématologiques [136], [139]. En étudiant l'activité de ces constructions et en les comparant, nous souhaitons définir les zones de ce promoteur différemment actives dans les lignées JOK-E et JOK-R afin d'affiner les séquences à investiguer, voire de déterminer plus précisément le ou les facteurs de transcription à étudier.

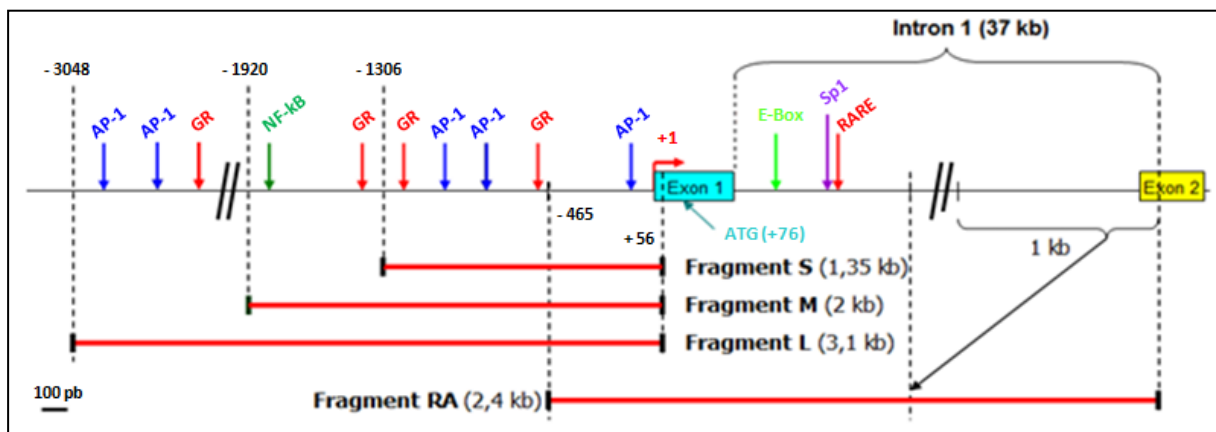


Figure 25 : Schéma explicatif des différentes constructions du promoteur du gène *CD38*. Les flèches verticales descendantes indiquent des sites de fixation (potentiels ou avérés) de facteurs de transcription. La flèche rouge identifiée « +1 » marque le site d'initiation de la transcription. Le fragment RA est une fusion de la région -465 à +911 avec la fin de l'intron 1 et le début de l'exon 2.

Afin de déterminer si nos constructions contenant les fragments de promoteur de *CD38* encadraient bien une zone active du promoteur de *CD38*, nous avons mesuré l'activité des constructions S et M dans les lignées cellulaires HCL EH (présentant une expression faible de *CD38*) et HC-1 (présentant une expression forte), nous servant de contrôles de la fonctionnalité de ces constructions. Comme l'atteste la **Figure 26**, l'activité promotrice de *CD38* est bien plus forte dans la lignée HC-1 que dans EH, et ce pour les 2 constructions. De plus, on observe une activité légèrement supérieure pour la construction S dans les 2 lignées. Ceci est en accord avec le taux d'expression des transcrits et prouve que ces constructions sont bien fonctionnelles.

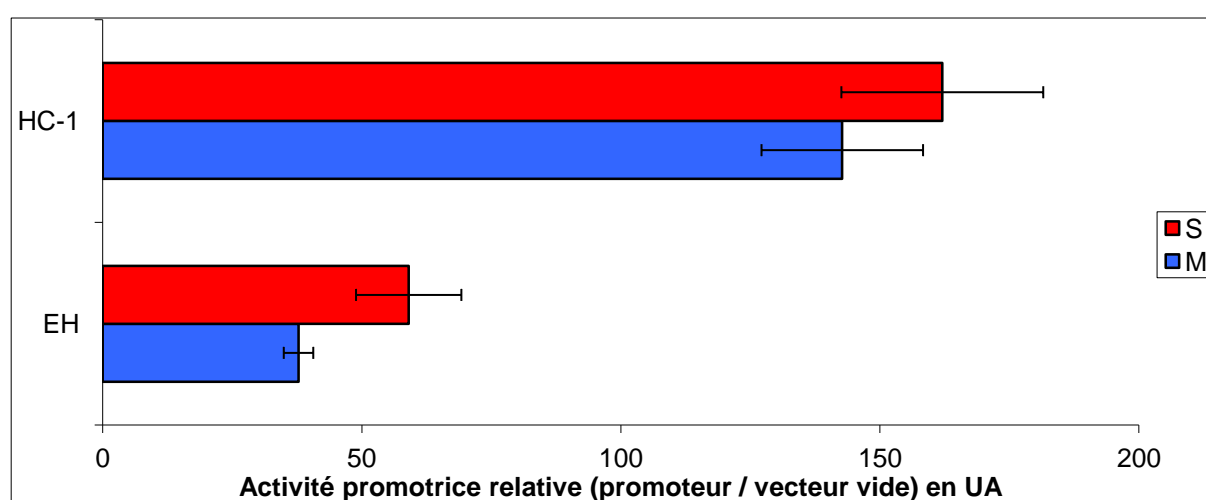


Figure 26 : Activité promotrice relative obtenue pour les fragments S et M dans les lignées cellulaires HC-1 et EH. 16 h après co-transfection des plasmides rapporteurs et du vecteur contrôle *pRSV-β-Gal*, les cellules sont centrifugées, lavées une fois au PBS et l'activité luciférase relative est mesurée (cf. **Matériel et Méthodes p. 73-74**). Les barres d'erreur représentent l'écart-type. L'activité luciférase relative du vecteur vide est fixée comme égale à 1. UA = Unité Arbitraire. (n=4).

c. Modulation de l'expression de *CD38* par des stimuli extracellulaires dans le modèle JOK-E / JOK-R

Le TNF- α et l'ATRA figurent parmi les molécules capables de moduler l'expression de *CD38* [134], [136]. Afin d'étayer nos hypothèses, nous avons stimulé les lignées JOK-E et JOK-R avec ces 2 molécules, afin d'essayer d'observer dans la lignée JOK-R une possible diminution de la répression de l'expression de *CD38*. Alors que le TNF- α ne module pas les taux d'ARNm *CD38* (cf. **Figure 27**), la stimulation par 1 μ M d'ATRA provoque l'augmentation des transcrits *CD38* et de l'expression de surface de la protéine, et semble lever partiellement sa répression dans la lignée JOK-R, après 24 h et surtout 48 h (cf. **Figure**

28 et 29). Ces observations argumentent en faveur d'un rôle de l'élément RARE dans la régulation de *CD38* par RhoH.

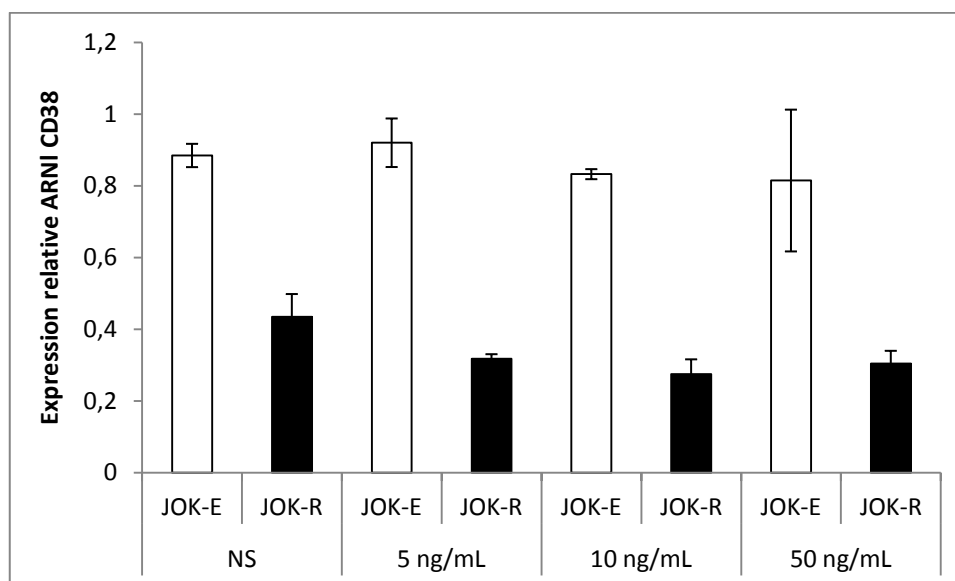


Figure 27 : Expression des transcrits *CD38* dans la lignée JOK-R relativement à la lignée JOK-E, après stimulation au TNF- α . Des concentrations croissantes de TNF- α ou le même volume de solvant (eau, condition NS) sont ajoutés au milieu de culture. Les cellules sont incubées pendant 24 h. Elles sont ensuite récupérées et analysées par Q-RT-PCR (cf. **Matériel et Méthodes p. 61**). Les barres représentent l'expression relative de *CD38* \pm l'écart-type. NS : Non Stimulé. (n=2).

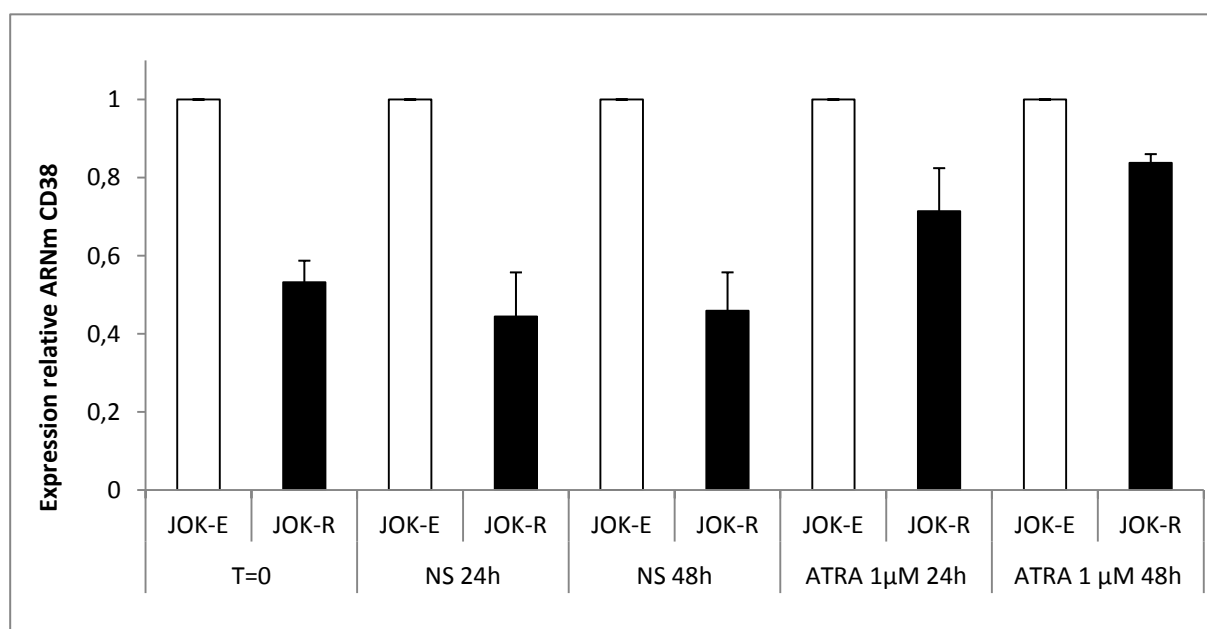


Figure 28 : Expression des transcrits *CD38* dans la lignée JOK-R relativement à la lignée JOK-E, après stimulation à l'ATRA. 1 μ M d'ATRA ou le même volume de solvant (EtOH, condition NS) sont ajoutés au milieu de culture. Les cellules sont incubées pendant 24 h ou 48 h. Elles sont ensuite récupérées et analysées par Q-RT-PCR (cf. **Matériel et Méthodes p. 61**). Les barres représentent l'expression relative de *CD38* \pm l'écart-type. NS : Non Stimulé. (n=3).

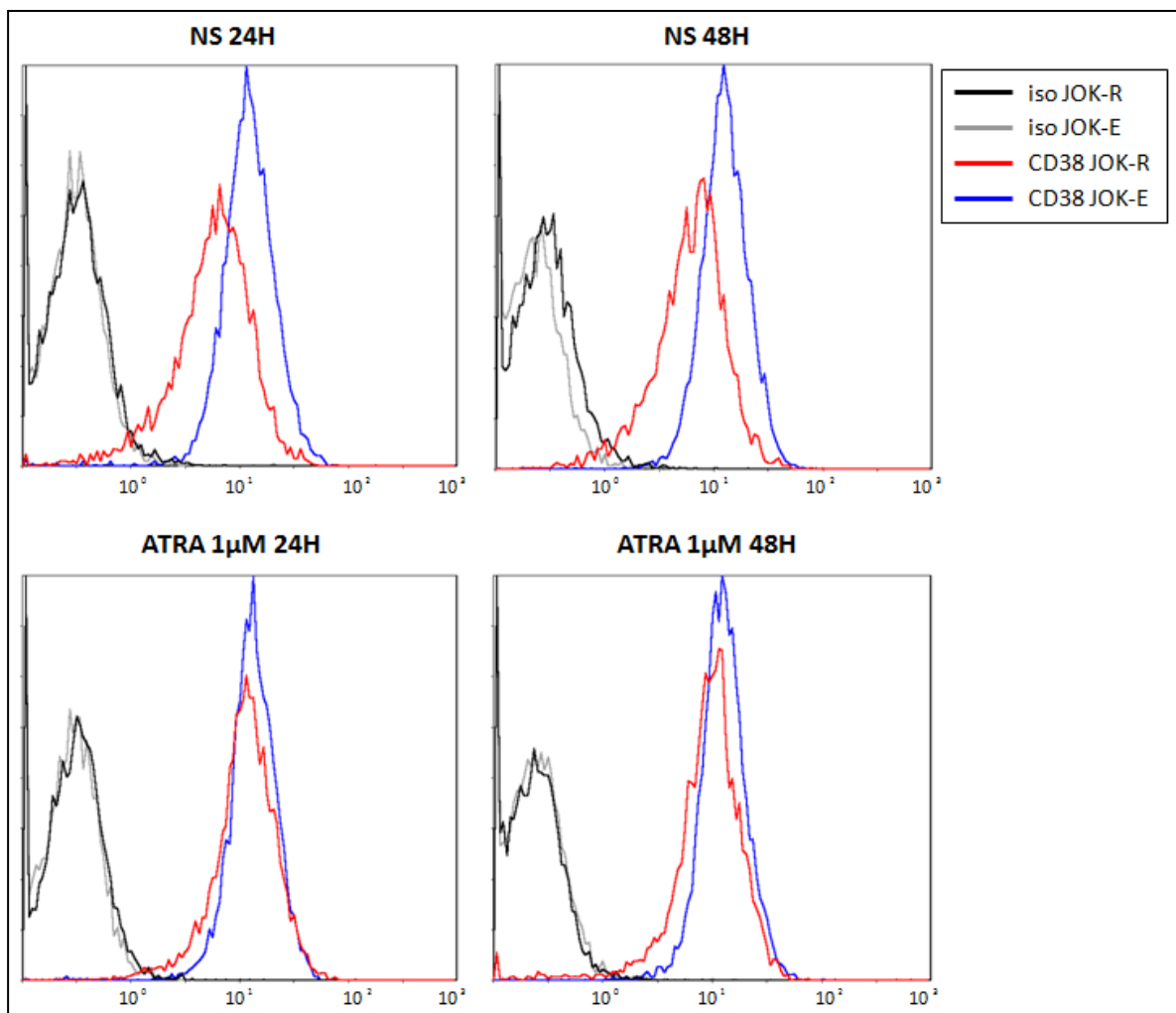


Figure 29 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de surface de CD38, après stimulation par l'ATRA. 1 μ M d'ATRA ou le même volume de solvant (EtOH) sont ajoutés au milieu de culture. Les cellules sont incubées pendant 24 h ou 48 h, puis sont ensuite récupérées et analysées par cytométrie en flux (cf. **Matériel et Méthodes p. 59**). Les histogrammes sont représentatifs de 3 expériences. La fluorescence est indiquée en échelle logarithmique.

d. Influence de RhoH sur l'activité promotrice du gène CD38

Nous avons ensuite voulu comparer l'activité promotrice relative de nos quatre constructions dans le modèle JOK-E/JOK-R. Cependant, comme en témoigne la **Figure 30**, pour chaque construction, l'activité promotrice ne présente pas de différence significative entre JOK-E et JOK-R.

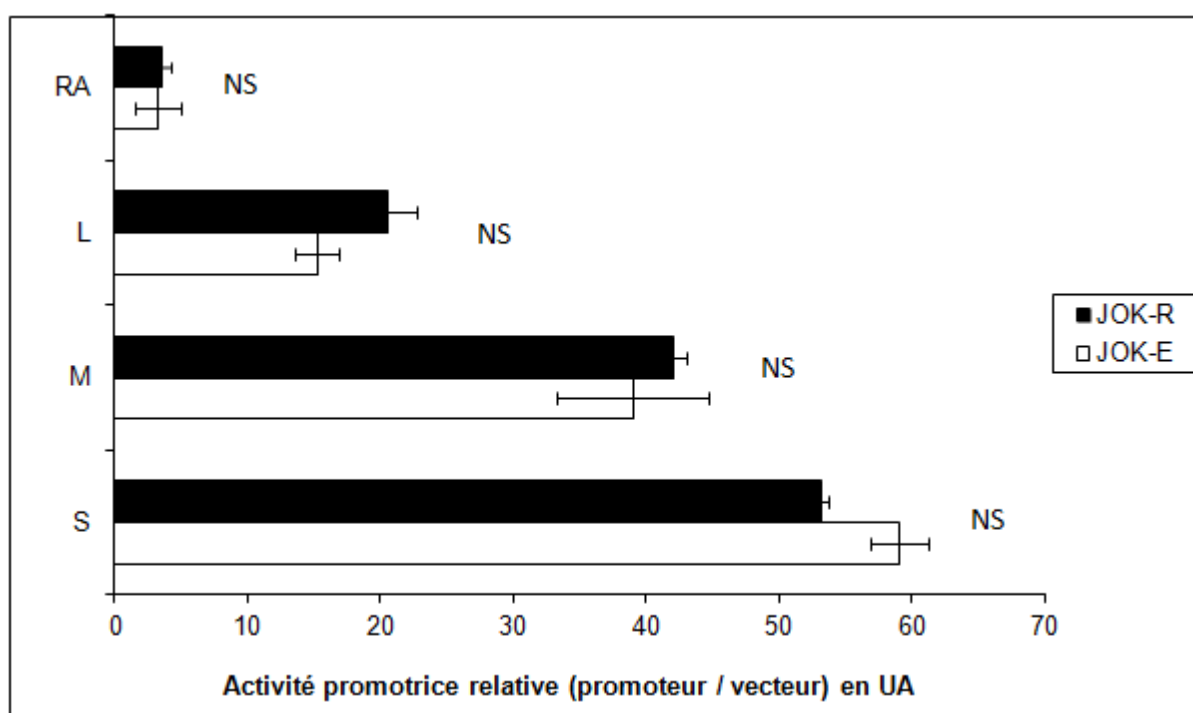


Figure 30 : Activité promotrice relative obtenue pour les fragments S, M, L et RA dans les lignées cellulaires JOK-E et JOK-R. 16h après co-transfection des plasmides rapporteurs et du vecteur contrôle *pRSV-β-Gal*, les cellules sont centrifugées, lavées une fois au PBS et l'activité luciférase relative est mesurée (cf. **Matériel et Méthodes p. 73-74**). Les barres d'erreur représentent l'écart-type. L'activité luciférase relative du vecteur vide est fixée comme égale à 1. UA = Unité Arbitraire ; (n=4 ; Paired t-test : NS = non significatif).

L'activité la plus forte est toujours celle du fragment S, laissant penser à la présence d'éléments essentiels à la transcription du gène *CD38* dans ce fragment d'ADN, mais n'étant pas régulés de manière significative par RhoH.

D'autre part, on observe une activité faible du fragment RA. Pour tester la fonctionnalité de la construction RA, celle-ci a été transfectée dans les cellules JOK-E et JOK-R puis une stimulation par l'ATRA a été réalisée pendant 24 h ou 48 h. L'activité promotrice relative montre une réponse à la stimulation par l'ATRA, avec une activité augmentée entre 2 et 3,5 fois par rapport au contrôle non stimulé par l'ATRA (cf. **Figure 31**). Un problème de conception de la construction plasmidique ne semble donc pas être à l'origine de la faible activité du fragment RA dans le modèle JOK +/- RhoH.

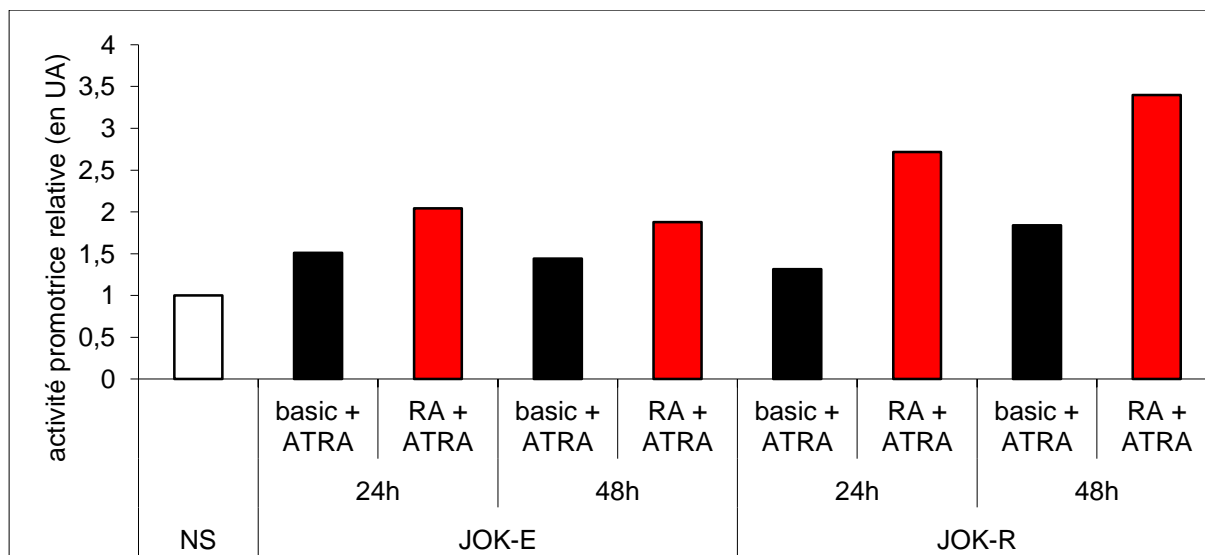


Figure 31 : Stimulation de l'activité promotrice du fragment RA par l'ATRA dans le modèle JOK-E/JOK-R. 16h après co-transfection des plasmides rapporteurs et du vecteur contrôle *pRSV-β-Gal*, les cellules sont stimulées ou non par 1 μM d'ATRA. Après 24 h ou 48 h, elles sont centrifugées, lavées une fois au PBS et l'activité luciférase relative est mesurée (cf. **Matériel et Méthodes p. 73-74**). Pour chaque condition, l'activité promotrice dans les cellules non stimulées correspondantes est fixée à 1. Les barres représentent l'activité promotrice relative. NS = Non Stimulé, Basic = pGL4.14 vide, RA : pGL4.14 RA, UA : unités arbitraire (n=1).

Devant cette impossibilité à trouver directement une zone du promoteur de *CD38* dont l'activité était modulée par RhoH, nous avons envisagé deux approches alternatives : la première consistait à repartir des données du transcriptome afin de déceler une autre cible de RhoH pouvant être un partenaire intermédiaire dans la régulation du gène *CD38*, la seconde à envisager une régulation post-transcriptionnelle des ARNm *CD38* par RhoH.

3. Le facteur de transcription Smad1

a. Données transcriptomiques

Suite à l'impossibilité de déterminer quelle région du promoteur du gène *CD38* était impliquée dans la répression de son expression par RhoH, nous avons adopté une seconde stratégie, d'ailleurs complémentaire de la première. Nous sommes repartis des données du transcriptome afin d'observer si la forte répression de *CD38* était accompagnée de la modulation concomitante d'un facteur de transcription. Nous avons ainsi observé la surexpression du gène *SMAD1* d'un facteur 6,3 dans la lignée JOK-R. (La liste présentant l'ensemble des gènes différemment régulés dans cette étude transcriptomique est présentée dans l'**Annexe 10**).

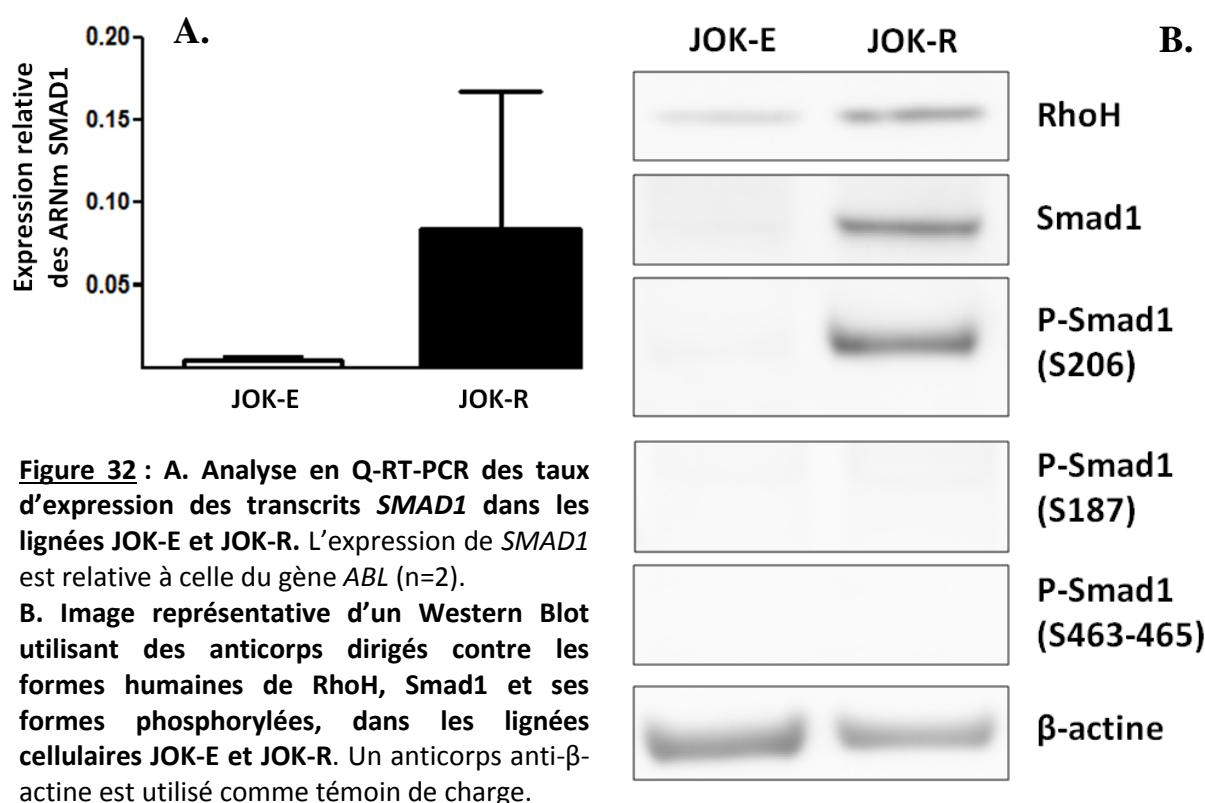
La famille des modulateurs transcriptionnels Smad comprend 8 membres chez l'humain, répartis en 3 sous groupes : **1)** les R-Smads (*receptor regulated Smad*) comprenant Smad1/2/3/5/8 ; **2)** les co-Smads (*common partner Smad*) tel Smad4 ; **3)** les *inhibitory Smads* comprenant Smad6 et 7. Les R-Smads sont activés par les récepteurs BMP (*Bone Morphogenic Proteins*) de type I (dont les ligands sont les protéines BMP) pour Smad1,5 et 8 alors que Smad2 et Smad3 sont activés par les récepteurs BMP de type II [dont les ligands sont les molécules TGF (*Transforming Growth Factor*)]. Le facteur co-Smad4 s'hétérodimérise avec les R-Smad pour induire l'activité transcriptionnelle. Smad6 et Smad7 inhibent les signaux de la voie du TGF et provoquent la dégradation des R-Smads.

La structure de Smad1 s'articule autour de 2 domaines : le domaine MH1 possédant le site de liaison à l'ADN et le domaine MH2 servant à l'interaction avec ses partenaires (récepteurs et co-Smad). Ce facteur de transcription agit sous forme de dimère et est activé par les protéines de la famille BMP via les récepteurs ALK1/2/3 et 6 [230]. De manière intéressante, le transcriptome nous indique que le gène *BMP7* est également surexprimé d'un facteur 4,3 dans la lignée JOK-R par rapport à la lignée JOK-E.

Smad1 peut agir comme un activateur ou un répresseur transcriptionnel. C'est cette action répressive qui nous intéressera particulièrement. Ainsi, des expériences de gène rapporteur ont montré que Smad1 s'oppose à l'effet transactivateur de *HoxB4* dans la lignée de fibroblaste murin NIH3T3. De plus, Smad1 inhibe l'expression du gène *IRX5* induite par *HoxB4* durant l'embryogénèse du Xénope [231]. Le facteur *Nkx3.2* recrute Smad1 pour exercer son pouvoir transrépresseur dans la lignée cellulaire COS-7 [232].

b. *RhoH* réprime l'expression de Smad1 dans le modèle JOK-E/JOK-R

Nous avons ensuite cherché à confirmer ces résultats transcriptomiques par Q-RT-PCR et Western Blot. Ainsi, la lignée JOK-R présente bien un taux de transcrits *SMAD1* plus élevé que la lignée JOK-E (cf. **Figure 32, A**), corrélé à une augmentation du taux d'expression de la protéine (cf. **Figure 32, B**). L'étude des formes phosphorylées de Smad1 nous a montré que cette protéine était activée sur le résidu Ser206 dans ce modèle, mais pas sur les résidus Ser463-465, ni Ser187 (cf. **Figure 32.B**).



c. Recherche bioinformatique de sites de fixation de Smad1 sur le promoteur du gène CD38

Le facteur de transcription Smad1 se lie à l'ADN sur des éléments *cis* appelés SBE (pour *Smad Binding Elements*). Ces SBE sont formés préférentiellement de multimères du motif GTCT (ayant la plus forte affinité pour les facteurs Smads) mais aussi des motifs GCAT ou GCCG sur lesquels les R-Smads se lient plus faiblement [233], [234]. Des mutations dans ces séquences diminuent leur potentiel modulateur de la transcription. Certaines séquences plus spécifiques ont été décrites, tels les palindromes GCCGCC et GTCTAGAC qui peuvent intrinsèquement constituer des SBE [233], [235]. De même, la séquence **CAGACA** constitue un SBE au sein du promoteur du gène *JUNB*, les nucléotides AG et C (notés en rouge) étant ceux qui interagissent directement avec les protéines Smad [234], [236], [237]. La combinaison de ces différents motifs dans un promoteur augmente l'intensité de la réponse aux membres des familles TGF et BMP.

Avant de nous intéresser à l'étude d'une possible régulation de l'activité du promoteur de *CD38* par Smad1, nous avons recherché la présence de SBE dans ce promoteur (**Figure 33**), dans la séquence du fragment S.

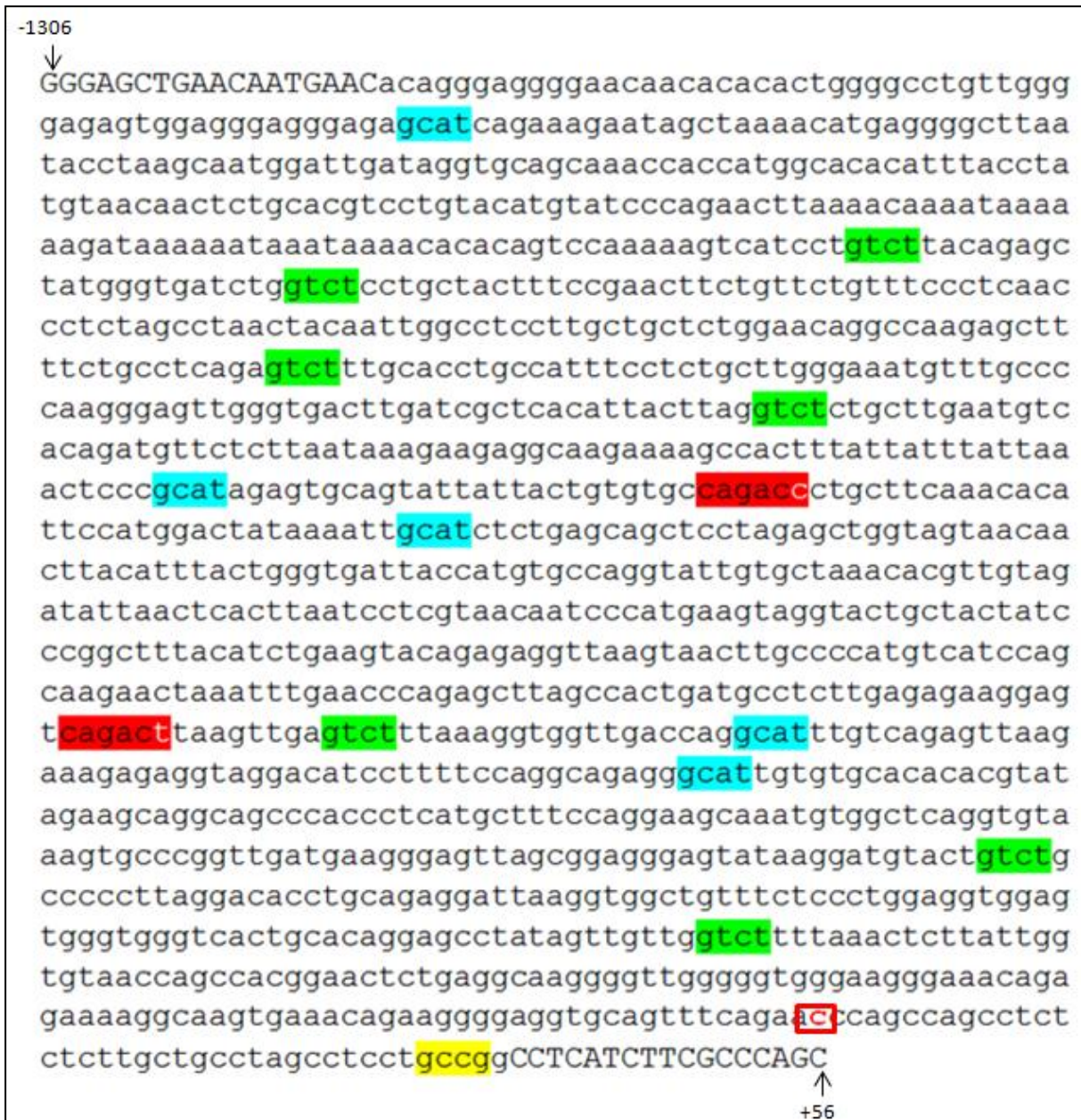


Figure 33 : Recherche de sites SBE dans la partie 5' génomique du gène *CD38* (fragment S). EN MAJUSCULES : séquence des primers encadrant la construction promotrice « S » / **En vert** : motif GTCT / **En bleu** : motif GCAT / **En jaune** : motif GCCG / **En rouge** : motif CAGACA / **En blanc** : nucléotide dégénéré / **Encadré en rouge** : nucléotide [+1].

La construction CD38-S, contenant la région proximale du promoteur du gène *CD38* a montré une forte activité et sa séquence présente de nombreux SBE potentiels, que ce soit des tétramères en série ou des motifs dégénérés de type CAGACA dont la fonctionnalité n'est pas abolie (CAGACC et CAGACT). Cette richesse en SBE potentiels est en faveur de l'hypothèse d'une régulation possible de l'expression de *CD38* par Smad1.

d. Expression transitoire de Smad1 dans la lignée JOK-1 parentale

L'étude de l'impact de Smad1 sur la régulation de l'expression de *CD38* a été réalisée par transfection transitoire d'un vecteur d'expression protéique de Smad1 dans la lignée JOK-1 parentale. Une analyse de l'expression des transcrits et de la protéine Smad1 24 h post-transfection nous confirme l'efficacité de l'expression ectopique de Smad1 (**Figure 34, A. et B.**).

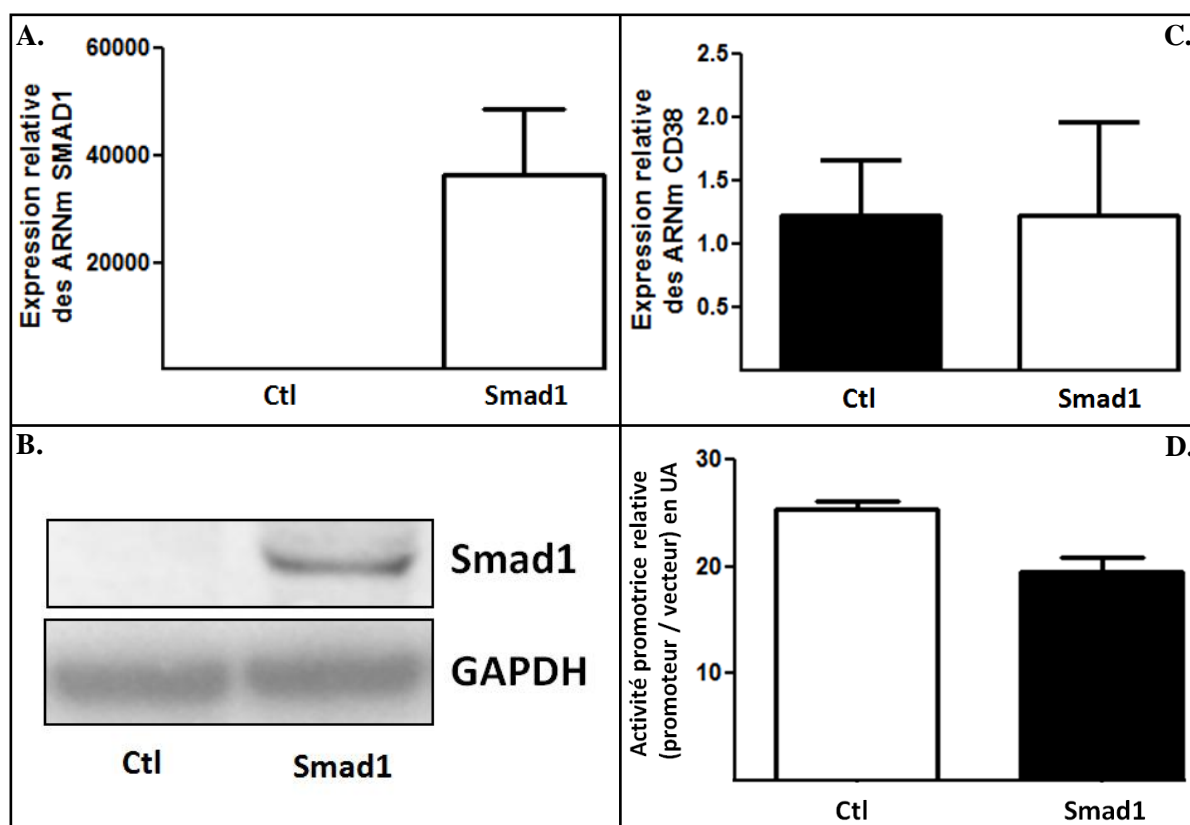


Figure 34 : A. Vérification par Q-RT-PCR des taux d'expression des transcrits *SMAD1* dans la lignée JOK-1 transfectée par un vecteur d'expression de Smad1. L'expression de *SMAD1* est relative à celle du gène *ABL* (n=2). **B. Image représentative d'un Western Blot utilisant des anticorps dirigés contre la protéine Smad1 humaine dans la lignée cellulaire JOK-1 transfectée par un vecteur d'expression de Smad1.** Un anticorps anti-GAPDH est utilisé comme contrôle de charge. Dans les 2 cas, les cellules sont transfectées par 5 µg de plasmide *pENTER* « vide » (condition Ctl) ou *pENTER-Smad1*. 24 h après transfection, des culots cellulaires sont récupérés, lavés au PBS puis l'ARNm et les protéines sont extraits pour l'analyse en Q-RT-PCR et en Western Blot. **C. Analyse en Q-RT-PCR des taux d'expression des transcrits *CD38* dans la lignée JOK-1 surexprimant Smad1.** Les cellules ont été transfectées par 5 µg de plasmide *pENTER* « vide » (condition Ctl) ou *pENTER-Smad1*. 24 h après transfection, des culots cellulaires sont récupérés, lavés au PBS puis l'ARNm est extrait et analysé par Q-RT-PCR. L'expression de *CD38* est relative à celle du gène *ABL* (n=4). **D. Activité promotrice du fragment S dans la lignée JOK-1 surexprimant Smad1.** Les cellules sont co-transfectées par 3 µg de plasmide *pENTER* « vide » (condition Ctl) ou *pENTER-Smad1*, 1,6 µg de plasmide pGL4.14 [*Luc2/Hygro*]/*CD38-S* et 0,25 µg de vecteur contrôle pRL-CMV. 16 h après transfection, des culots cellulaires sont récupérés, lavés au PBS et l'activité luciférase relative est mesurée (cf. **Matériel et Méthodes p. 73-74**) (n=5 ; Paired t-test : p = 0,0083).

La surexpression de Smad1 dans cette lignée cellulaire induit-elle une répression de l'expression des transcrits *CD38* et de l'activité promotrice de ce gène? 24 h après transfection, les taux d'ARNm *CD38* ne semblent pas être modifiés par la surexpression de Smad1 (cf. **Figure 34, C.**). Notons une déviation standard importante entre les expériences. Cependant, le promoteur de *CD38* (fragment S) montre une activité diminuée 16 h après co-transfection avec le vecteur d'expression de Smad1 (cf. **Figure 34, D.**). Une expérience similaire mais encore préliminaire réalisée avec le fragment M du promoteur de *CD38* confirme cette tendance (diminution de l'activité promotrice de *CD38* par Smad1).

Ces données nous orientent donc vers un rôle probable de Smad1 dans le mécanisme de régulation de l'expression de *CD38* par RhoH. Une investigation plus poussée serait cependant nécessaire afin de confirmer cette hypothèse.

4. Hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle du gène *CD38* par RhoH

a. *RhoH* semble diminuer la stabilité des ARNm *CD38*

Les données de la littérature ont déjà montré la possibilité d'une régulation post-transcriptionnelle du gène *CD38*, par la voie Erk ou par des microARNs qui modifient la demi-vie de ses ARNm [134], [142], [143]. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé une inhibition de la *RNA polymerase II* grâce à l'actinomycine D dans notre modèle JOK-E/JOK-R et mesuré les taux des ARNm *CD38* par qRT-PCR, en utilisant le gène *GAPDH* comme référence (gène ayant montré la plus forte stabilité parmi nos gènes de référence). La manipulation a été effectuée sur 96 h, les temps d'incubation courts (inférieurs à 12 h) n'ayant montré aucune modification des quantités d'ARN *CD38*. Nous avons alors observé une décroissance des ARNm plus rapide dans la lignée JOK-R par rapport à la lignée JOK-E (cf. **Figure 35**).

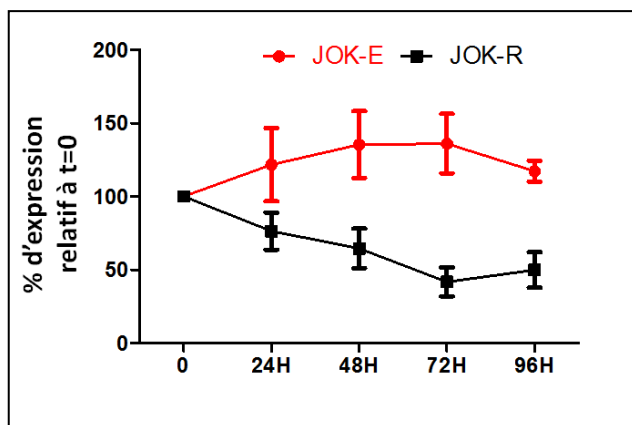


Figure 35 : Décroissance du taux des ARNm *CD38* par l'actinomycine D dans le modèle JOK-E/JOK-R (expression relative à celle du gène *GAPDH*). Les cellules sont incubées dans du milieu complet contenant 10 µg/mL d'actinomycine D. Au temps indiqué, les cellules sont centrifugées, lavées au PBS, et les ARNs sont extraits et quantifiés. (cf. **Matériel et Méthodes p. 61**). La quantité d'ARNm à t=0 a été fixée à 100%. Chaque ADNc a été mesuré au moins 2 fois en duplicat (n=3, two-way ANOVA : $p < 0.001$).

Cependant, dans cette expérience, le mode de quantification relative à l'expression d'un gène de référence induit un biais, car la transcription de ce gène est elle aussi interrompue par l'action de l'actinomycine D et le taux de transcrits de ce gène de référence diminue également au fur et à mesure du temps. Ainsi, dans la lignée JOK-E, nous avons l'impression d'une stagnation, voire d'une augmentation de la quantité d'ARNm *CD38*, due à une décroissance légèrement plus rapide de la quantité d'ARNm *GAPDH* par rapport aux ARNm *CD38*. Les transcrits *GAPDH* étant connus pour être très stables, on peut en conclure une grande stabilité des ARNm *CD38* dans la lignée JOK-1.

Afin de palier à ce problème de gène de référence, nous avons également réalisé une quantification absolue des ARNm *CD38* lors de ces expériences. Une quantité fixe de 100 ng d'ADNc étant ajoutée à chaque réaction de qRT-PCR, et une courbe de calibration étant générée pour chaque plaque, la quantité absolue de transcrits *CD38* peut être déterminée. Cette méthode semble confirmer les observations de la Figure 35, à savoir une stabilité moindre des ARNm *CD38* lorsque RhoH est surexprimée (cf. **Figure 36**). Cependant, l'absence de normalisation par un gène de référence génère une forte déviation standard, nous empêchant de conclure formellement sur un rôle de RhoH dans la stabilité des ARNm.

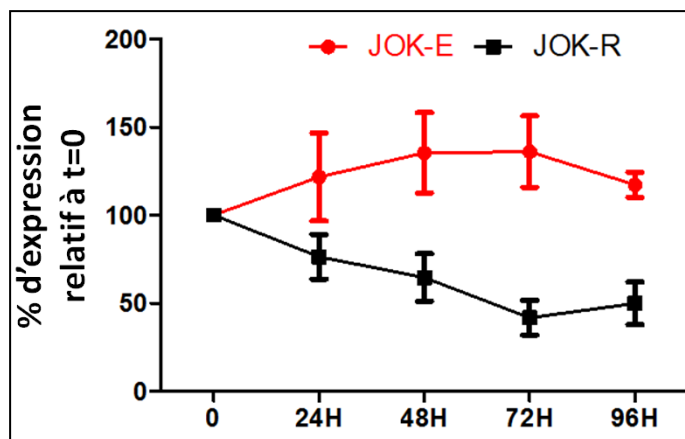


Figure 36 : Décroissance du taux des ARNm *CD38* par l'actinomycine D dans le modèle JOK-E/JOK-R (quantification absolue). Les cellules sont incubées dans du milieu complet contenant 10 µg/mL d'actinomycine D. Au temps indiqué, les cellules sont centrifugées, lavées au PBS, et les ARNs sont extraits et quantifiés. (cf. **Matériel et Méthodes p. 61**). La quantité d'ARNm à t=0 a été fixée à 100%. Chaque ADNc a été mesuré au moins 2 fois en duplicat (n=3)

La qRT-PCR ne constitue pas la méthode de choix pour mesurer la décroissance des ARNm, de par ces problèmes de gène de référence. La visualisation des ARNm par Northern Blot est la technique la plus adaptée pour observer ce phénomène. Nous nous sommes alors attelés à mettre au point cette technique au laboratoire. La première étape a été de concevoir une sonde oligonucléotidique biotinylée afin de détecter spécifiquement les ARNm *CD38*.

b. Technique de « run-off »

L'intérêt de la mise au point de cette sonde spécifique des transcrits *CD38* était double. En effet, à cette étape du projet, la question de savoir si la répression de l'expression de *CD38* par RhoH était liée à un phénomène transcriptionnel ou post-transcriptionnel restait en suspens. La quantité d'ARNm d'un gène à un instant t est la résultante d'une balance entre transcription du gène et stabilité des ARNm déjà présents. Nous avons alors l'intention d'étudier la néobiosynthèse des transcrits *CD38* par une technique de transcription *in vitro* appelée « run-off », dont le principe est expliqué dans la **Figure 37** [238]. Cette technique a pour but de détecter les copies d'ARNm spécifique nouvellement synthétisées, sur un temps très court, et donc de mesurer uniquement la transcription « instantanée », indépendamment de la stabilité de l'ARNm. A cette fin, nous souhaitons entamer une collaboration avec le Pr Philippe Gervois de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Lille. Cependant, nos ambitions ont été freinées devant l'impossibilité de générer une sonde capable de détecter spécifiquement les transcrits *CD38*.

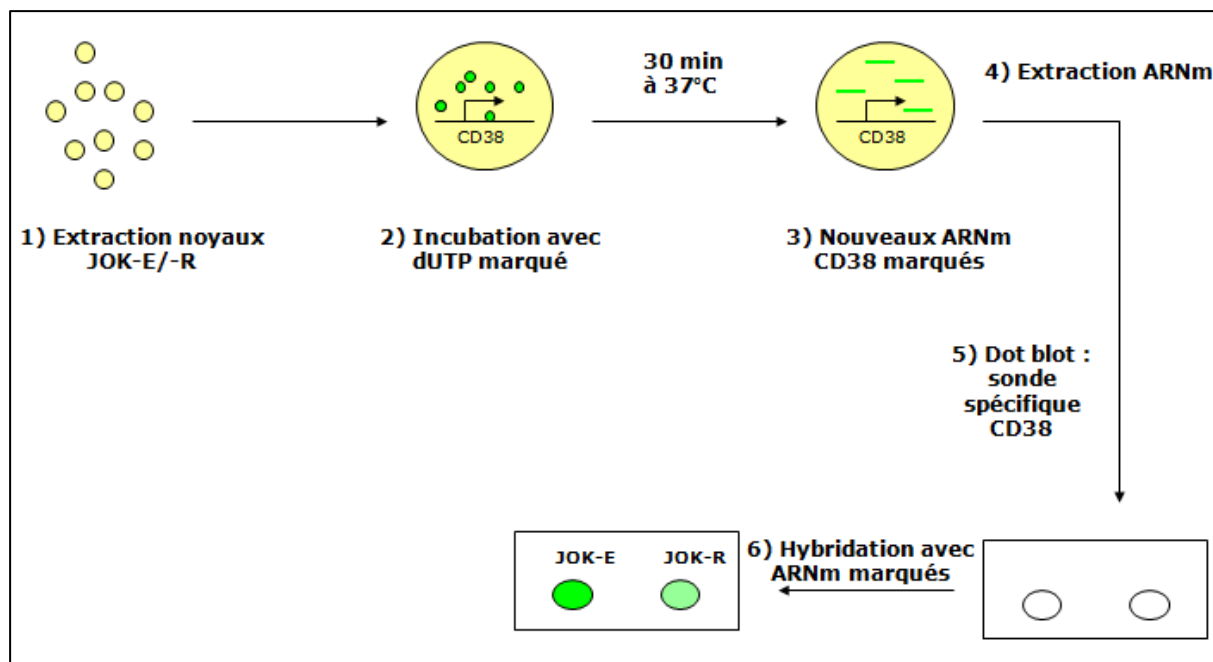


Figure 37 : Schéma explicatif de la technique de transcription « run-off ». Les noyaux des cellules d'intérêt sont extraits et incubés en présence de dUTP marqué (par un isotope radioactif ou de la biotine) pendant un temps court (typiquement, 30 min à 37°C). Ce laps de temps permet de marquer les ARNs néosynthétisés uniquement. Ceux-ci sont extraits et purifiés, puis incubés avec une sonde spécifique des transcrits d'intérêt (dans notre cas, ceux du gène *CD38*) ayant été immobilisée en excès sur une membrane de nitrocellulose, par dot-blot. L'hybridation des ARNm sur la sonde *CD38* fournit un signal dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ARNm néosynthétisé.

Cet échec dès la tentative de mise au point d'une sonde spécifique des transcrits *CD38*, ainsi que les impératifs de temps et de moyens nous ont donc poussés à privilégier d'autres aspects du projet.

Dans l'hypothèse où *CD38* serait effectivement régulé de manière post-transcriptionnelle, nous avons exploré 2 voies caractéristiques de ce type de régulation : les microARNs et les facteurs protéiques se fixant aux ARNm et modulant en *trans* leur stabilité.

c. Recherche bioinformatique de microARNs ciblant *CD38*

La capacité des microARNs 140-3p et 708 à moduler la stabilité des ARNm *CD38* a déjà été démontrée [142], [143]. Forts de cette constatation, nous nous sommes intéressés aux microARNs pouvant cibler l'ARNm *CD38* et potentiellement diminuer sa stabilité. Nous disposons au laboratoire des résultats d'une étude de « *microRNA array* », menée par Sylvie

Galiègue-Zouitina parallèlement à l'étude transcriptomique, comparant les lignées JOK-E et JOK-R. Parmi les microARNs différemment exprimés entre ces 2 lignées :

- Les miR-140-3p et miR-708 montraient une expression faible et sans différence significative.
- Les miR 15a, miR-1228 et miR-940 étaient significativement surexprimés dans la lignée JOK-R.
- Les miR-125b, miR-155, miR-99a et miR-let7c étaient significativement sous-exprimés dans la lignée JOK-R.

Ces données ont ensuite été croisées avec une étude *in silico* des séquences cibles de miRs sur l'ARNm *CD38*. La recherche a été réalisée sur la séquence totale de l'ARNm *CD38*, avec une attention particulière apportée à son extrémité 3'-UTR. En effet, cette région des ARNm est le site de liaison privilégié des miRs sur leur cible. Le logiciel de prédiction TargetScan[®] a été utilisé pour cette recherche. Malheureusement, les données de cette étude computationnelle n'ont révélé que des sites de liaison faiblement conservés pour tous les miRs retrouvés, avec des scores de prédiction faibles. Les miR-140-3p et miR-708 ont été prédits se fixer par cette analyse, mais eux aussi avec des sites de liaison peu conservés (cf. **Annexe 4**). Cette librairie de sites de prédiction, même peu conservés, a tout de même été croisée avec les données du *microRNA array*. Malheureusement, aucun miR commun aux deux listes n'a été trouvé, ne permettant pas de dégager une cible intéressante pour une étude plus poussée. Il en est de même pour l'analyse effectuée avec le logiciel TarBase[®] (cf. **Annexe 5**).

d. Recherche de sites potentiels de liaison de facteurs trans stabilisant ou déstabilisant l'ARNm CD38

La stabilité des ARNm est un phénomène complexe, faisant intervenir des partenaires se liant directement à leur structure comme les ARN non codants (tels les miRNAs) ou des protéines se liant à l'ARN (ou RBPs pour *RNA-binding proteins*). Les interactions avec ces RBPs conduisent pour une part à une modification de la cinétique des voies de dégradation des ARNm, qui font intervenir des enzymes de désadénylation, de « *decapping* » et des exonucléases. Ainsi, les RBPs peuvent accélérer ou freiner l'action de ces enzymes et se lient à des éléments *cis* précis situés sur leur ARNm cible. Ces motifs sont des séquences riches en adénine et uridine appelé AU-rich elements (AREs) ou en guanine et uridine appelé GU-rich

elements (GREs), et se situent dans la région 3'UTR des ARNm. Les AREs étant bien plus documentés que les GREs, nous avons axé notre étude sur ces séquences [239].

Ces AREs consistent en des séquences répétées du pentamère AUUUA entourées de séquences U riches ou parfois d'autres motifs U riches, tel un unique nonamère UUAUUUAU [239], [240]. Nous avons donc entrepris une étude de l'extrémité 3'UTR de l'ARNm du gène *CD38* afin de déterminer si de tels éléments y étaient présents, et pourraient expliquer une différence de stabilité de l'ARNm *CD38* entre les lignées JOK-E et JOK-R.

Cette recherche nous a permis de mettre en évidence la présence de 3 AREs putatifs à la fin de cette extrémité 3'UTR, ainsi que la présence d'un nonamère « dégénéré » sur son dernier nucléotide. Cette variation dans la séquence consensus entraîne une diminution de l'affinité pour les RBPs mais préserve la fonctionnalité du nonamère [240]. Des motifs de fixation de la RBP HuR ont également été trouvés [241], [242] (cf. **Figure 38**).

```
CCUGAGGAUUCACUUGCACAUUCUGAGAUCUGAGCCAGUCGUGUGGUUGUUUUAGCUCCUU
GACUCCUUGUGGUUUAUGUCAUCAUACAUGACUCAGCAUACCUGCUGGUGCAGAGCUGAAGA
UUUUGGAGGGUCCUCCACAAUAAGGUCAAUGCCAGAGACGGAAGCCUUUUUCCCAAAGUCU
UAAAAUAACUUAUAUCAUCAGCAUACCUUUUAUUGUGAUCUAUCAAUAGUCAAGAAAAUUUAU
UGUAUAAGAUAAGAAUGAAAUAUGUAUGUUAAGUUAACUUCACUUUAAUUCUCAUGUGAUCCU
UUUAUGUUAUUUAUAUAUUGGUAACAUCUUUCUAUUGAAAAUCACCACACCAAACCUCUC
UUAUUAGAACAGGCAAGUGAAGAAAAGUGAAUGCUCAGUUUUUCAGAAAGCAUUAUUAUUC
CAAAUGAAUGACCUUGUUGCAUGAUGUAUUUUUGUACCCUUCUACAGAUAGUCAAAACCAUA
AACUUC AUGGUCAUGGGUCAUGUUGGUGAAAAUUAUUCUGUAGGAUAUAAGCUACCCACGUA
CUUGGUGCUUUACCCCAACCCUCCAAACAGUGCUGUGAGGUUGGUAUUUAUUUCAUUUUUAG
AUGAGAAAAUGGAGCUCAGAGAGGUUAUAUUUAAGUUGGUGCAAAGUAUUUGCAAGUU
UUGCCACCGAAAGGA AUGGCAAACACAAUUAUUUUUGAACCAACCUAUAUUUAACCGUA
AGUCCUACAUUUAUAUCAAGCUAGAGACUGAAUUGAACUCAACUCUGUCCAACUCCAAAA
UUCAUGUGCUUUUCCUUCUAGGCCUUUCAUACCAAACUAAUAGUAGUUUAUAUUCUCUCC
AACAAAUGC
```

Figure 38 : Séquence de l'extrémité 3'UTR de l'ARNm *CD38*. En rouge : codon STOP ; surligné en vert : AREs putatifs ; surligné en rouge : nonamère AU-rich ; En blanc surligné rouge : nucléotide différent de la séquence consensus du nonamère ; en bleu : sites de fixation potentiels de la protéine HuR ; surligné en bleu ciel : séquences cibles du miR-140-3-p. L'extrémité 3'UTR du gène *CD38* comporte 844 nucléotides. Source : *UCSC Genome Browser*. [239]–[242]

Cette analyse nous fournit ainsi des éléments intéressants laissant penser à une possible régulation de la stabilité de l'ARNm *CD38* par des RBPs.

e. Etude des facteurs trans AUF-1, HuR et TTP dans le modèle JOK-E/JOK-R

Parmi les RBPs, trois protéines concentrent l'essentiel des interactions connues avec les AREs. La première, AUF-1/hnRPD (*AU-rich Factor 1/ Heterogeneous Nuclear RiboNucleoProtein D*), présente 4 isoformes (p37, p40, p42 et p45). Sa fixation sur les AREs modifie localement la structure de l'ARN et favorise sa dégradation. La seconde, TTP (Tristetraproline), se fixe aux AREs et interagit avec la désadénylase Ccr4, les enzymes de « *decapping* » et l'exonucléase Xrn1 pour promouvoir la dégradation des ARNm. Au contraire des deux dernières, HuR/ELAVL-1 (*Hu antigen R / Embryonic Lethal Abnormal Vision Like-1*) stabilise les ARNm en entrant en compétition pour la fixation sur les AREs avec d'autres RBPs favorisant la dégradation de ces derniers [239].

Le mécanisme d'action de ces RBP dépend de leur niveau d'expression mais également de leur répartition entre le noyau et le cytoplasme et de leur niveau de phosphorylation. Nous avons donc entrepris d'étudier ces paramètres, en réalisant un fractionnement cellulaire sur les lignées JOK-E et JOK-R et en mesurant les quantités de protéines AUF-1, TTP et HuR sur les lysats totaux ainsi que sur les fractions nucléaires et cytoplasmiques.

Comme le montre la **Figure 39**, aucune différence significative au niveau de l'expression totale ou de la balance nucléocytoplasmique de ces protéines n'est visible dans les deux lignées. Il semble y avoir une légère augmentation de l'isoforme p37 de AUF-1 dans les lysats totaux de la lignée JOK-R, mais qui n'est pas visible dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques (cf. **Figure 39, A.**). De même, une quantité légèrement supérieure de TTP dans les noyaux de la lignée JOK-R semble observée, mais une contamination par la fraction cytoplasmique pourrait en être l'origine (cf. **Figure 39, B**). De plus, cette augmentation n'est pas observable sur les réplicats biologiques de cette manipulation.

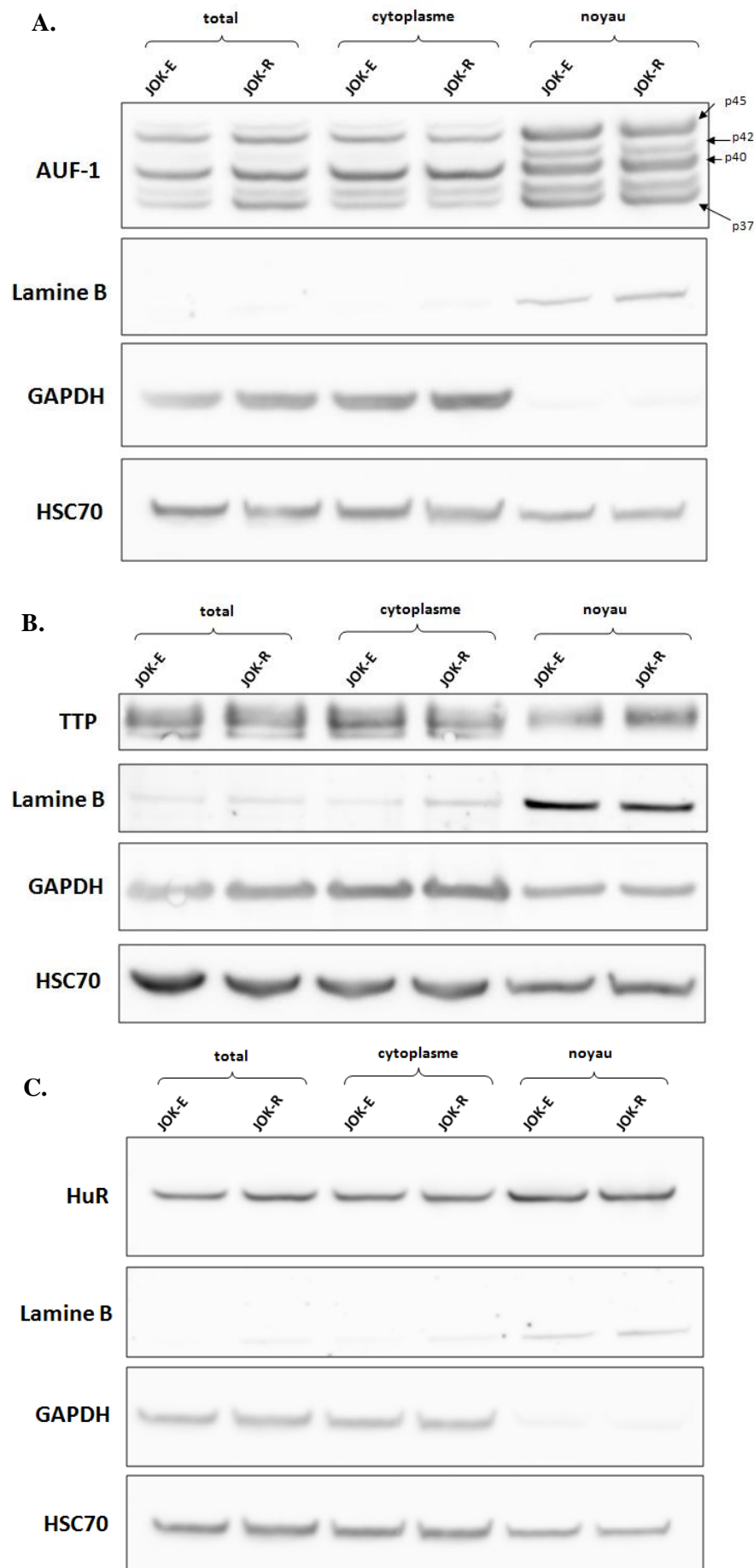


Figure 39 :
A. Western blot montrant l'expression des isoformes de AUF-1 sur les lysats totaux, cytoplasmiques et nucléaires des lignées JOK-E et JOK-R.

B. Western blot montrant l'expression de TTP sur les lysats totaux, cytoplasmiques et nucléaires des lignées JOK-E et JOK-R.

C. Western blot montrant l'expression de HuR sur les lysats totaux, cytoplasmiques et nucléaires des lignées JOK-E et JOK-R.

Un anticorps anti-lamine B est utilisé comme témoin de la pureté des fractions nucléaires et un anti-GAPDH pour la pureté des fractions cytoplasmiques. HSC-70 est utilisé comme témoin de charge. (n=3)

L'état de phosphorylation de ces RBPs est également importante dans leur mécanisme d'action. Cependant, aucun anticorps commercial spécifique des différentes formes phosphorylées de AUF-1, TTP et HuR n'existait au moment de notre étude. Nous avons donc initié des expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) de ces protéines sur des lysats de cellules JOK-E et JOK-R, grâce aux anticorps utilisés pour leur détection en Western Blot. Ces anticorps ne présentaient pas de bandes parasites en Western blot, ce qui laissait présager d'une immunoprécipitation spécifique. Cependant, ces co-IP se sont révélées aspécifiques, comme l'attestait la multitude de bandes observée après la coloration au nitrate d'argent d'un gel « test » sur les échantillons obtenus après co-IP. Des mises au point supplémentaires sur le protocole de co-IP étaient nécessaires. Les impératifs de temps ainsi que le développement des autres axes du projet ne nous ont pas permis de poursuivre ces investigations.

II. Impact de CD38 sur la progression tumorale de la leucémie à tricholeucocytes

Nous avons pu observer l'importance de *CD38* dans le développement des hémopathies malignes, et particulièrement celles de type B. Nous avons ainsi vu que CD38 est capable de promouvoir la survie, la prolifération et les interactions avec l'environnement des cellules de LLC, et qu'il favorise le développement d'une forme agressive de la maladie. L'intérêt de son ciblage par des anticorps thérapeutiques a récemment été prouvé de par leur efficacité dans le traitement du myélome multiple ; l'évaluation de leur bénéfice thérapeutique dans d'autres hémopathies malignes CD38 positives est en cours.

Bien que CD38 soit exprimé par 1/3 des patients souffrant d'HCL, son étude dans cette pathologie n'a jamais été abordée, malgré son rôle dans des phénomènes clefs de la progression tumorale de l'HCL, tels la survie, la prolifération et l'interaction avec le micro-environnement des cellules leucémiques.

Le second axe de ce travail doctoral a donc porté sur l'étude de l'impact de la protéine CD38, favorisant potentiellement la progression de la tricholeucocytose. Nous souhaitons moduler l'expression de cette protéine dans un modèle cellulaire d'HCL et observer les effets de cette modulation sur l'ensemble des phénomènes cités au paragraphe précédent.

1. Expression de CD38 dans les lignées cellulaires lymphoïdes B

Nous avons dans un premier temps étudié l'expression de la protéine CD38 dans le panel de lignées cellulaires HCL disponibles au laboratoire, afin de déterminer quel(s) modèle(s) pourrai(en)t être utilisé(s) pour notre étude. Nous observons une expression hétérogène de CD38, cohérente avec l'hétérogénéité d'expression chez les patients [227]. Les lignées EH/K et Eskol présentent une expression faible, celle de Hair-M est intermédiaire tandis que JOK-1 et HC-1 présentent une forte expression (cf. **Figure 40**). Ces résultats sont en accord avec les données d'expression des ARNm (cf. **Figure 24, p. 82**). Afin d'inscrire ces travaux dans la continuité des études précédemment réalisées au laboratoire, nous avons utilisé la lignée JOK-1 pour nos expériences fonctionnelles, dans laquelle nous avons invalidé l'expression de *CD38*. Nous avons réalisé la même invalidation dans la lignée HC-1 (qui possède le taux d'expression de CD38 le plus élevé) afin de chercher à confirmer les résultats obtenus dans la lignée JOK-1.

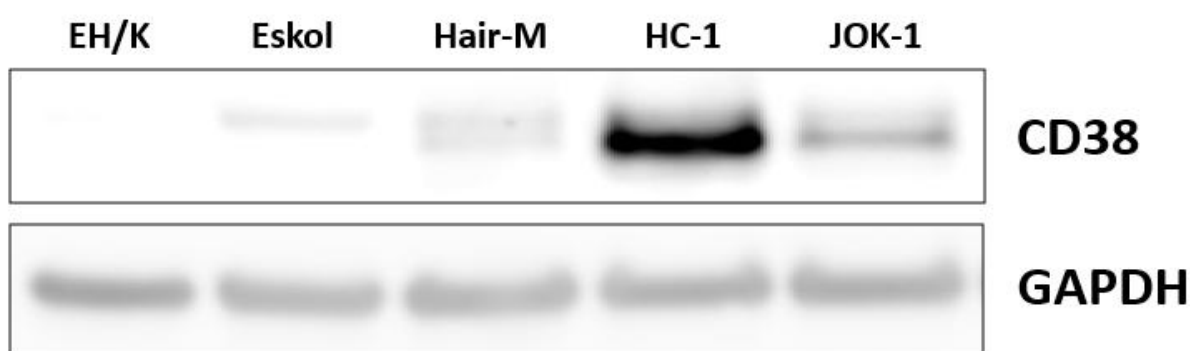


Figure 40 : Expression de la protéine CD38 totale dans les lignées cellulaires HCL. Un anticorps anti-GAPDH est utilisé comme témoin de charge.

2. Invalidation de CD38 dans les lignées cellulaires JOK-1 et HC-1

a. Stratégies d'invalidation

La première technique que nous avons utilisée pour tenter d'invalider l'expression du gène *CD38* dans nos lignées HCL a été l'utilisation de shRNA. Il s'agissait d'un ensemble de 4 shRNAs conçus et produits par la société Origene®. Ceux-ci ont été transfectés dans nos lignées selon notre protocole standard (cf. **Matériel et Méthodes p. 58**). Cependant, que ce soit en transfection transitoire ou après sélection des cellules ayant intégré le plasmide d'expression du shRNA (sélection par la puromycine), de même qu'en utilisant chaque shRNA seul ou en association, l'invalidation s'est montrée inefficace. L'expression de surface de *CD38* n'était pas diminuée. Une analyse des séquences des shRNAs présents dans ces plasmides commerciaux a révélé une mal-façon de ces vecteurs, la structure nucléotidique ne pouvant aboutir à la production d'un shRNA fonctionnel, et ce malgré le certificat de contrôle des échantillons fourni par Origene. Suite à l'envoi d'un second lot de plasmides, conforme cette fois-ci, l'invalidation ne s'est pas révélée plus efficace (données non montrées). Nous avons donc été contraints d'adopter une stratégie d'invalidation alternative.

Nous avons alors entrepris de mettre au point la méthode innovante du « *genome editing* » afin de réaliser un KO *in cellulo* du gène *CD38* [243]. Cette technique présente l'avantage de rompre totalement la structure du gène à invalider, aboutissant à l'expression nulle de la protéine (ou à des peptides sans activité), augmentant donc la capacité à observer des différences lors des tests fonctionnels sur les cellules invalidées ou non. Elle est de plus indépendante de l'expression stable d'un transgène, et ne nécessite donc pas l'intégration d'un plasmide au génome, évitant ainsi des biais de modifications dans l'expression d'autres gènes. D'autre part, ceci permet d'éviter la perte ou la diminution d'expression de ce transgène au court du temps et donc limite les risques de « dérive » du modèle. L'explication détaillée du principe de cette technique est décrite en **Annexe 7**.

b. Génération des lignées cellulaires JOK-1 et HC-1 KO pour l'expression de CD38

Nous avons utilisé la technique des ZFN (*Zinc Finger Nucleases*) grâce au procédé *CompoZR Knockout Zinc Finger Nucleases*®, commercialisé par la société Sigma-Aldrich (cf.

Annexe 7 pour le principe d'action des ZFNs). L'obtention d'une cellule KO pour l'expression de la protéine ciblée par les ZFN est un événement rare (environ 1%) et dépend de la lignée cellulaire étudiée. Afin d'isoler des clones cellulaires potentiellement invalidés, nous avons utilisé l'expression de surface de CD38 afin de trier par cytométrie en flux les cellules CD38 positives (WT) et négatives (KO) et de générer un mélange de cellules enrichi en clones (homo- et hétérozygotes) CD38⁻. Les cellules restées CD38⁺ après transfection par les plasmides codant pour les ZFN sont conservées comme contrôle. Ces 2 catégories de cellules ont été soumises à une dilution limite, afin de d'isoler des clones cellulaires CD38⁻ et CD38⁺ (cf. **Figure 41**).

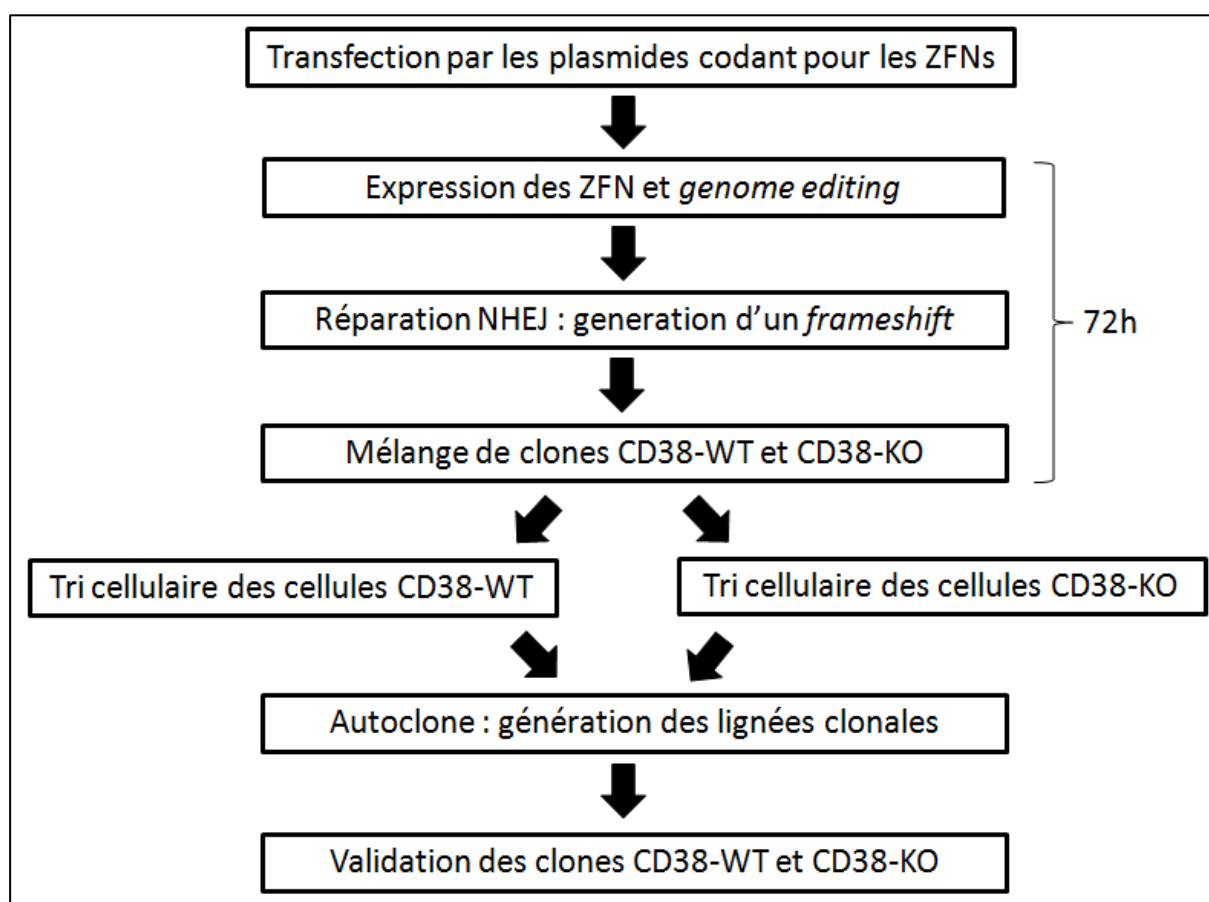


Figure 41 : Schéma explicatif de la stratégie de génération des lignées cellulaires CD38-WT et CD38-KO. Suite à la transfection des 2 plasmides codant pour les ZFNs, ces protéines sont exprimées transitoirement et réalisent une coupure double brin dans l'exon 1 du gène *CD38*. Par mécanisme NHEJ, un décalage du cadre de lecture ouvert (*frameshift*) de *CD38* est induit dans certains clones cellulaires, aboutissant à la génération d'un mélange de clones CD38-WT et CD38-KO. Ces clones CD38 « positifs » et « négatifs » sont ensuite séparés par tri cellulaire et cultivés en plaques 96-puits pour générer des lignées cellulaires clonales qui seront validées, pour leur invalidation de l'expression de *CD38* ou leur expression de ce même gène.

c. Validation du KO du gène CD38 dans les clones cellulaires JOK-

1

Pour la lignée JOK-1, parmi les cellules KO-CD38 isolées après tri, 15 clones ont pu être sélectionnés et amplifiés. La première étape de la validation a consisté en la vérification par séquençage Sanger de l'introduction d'une mutation « *frameshift* » dans la séquence du gène *CD38*. Nous avons retenu les clones présentant un « *frameshift* » homozygote de *CD38*, afin de s'assurer qu'aucune ré-expression de la protéine ne puisse être induite (par exemple, à partir d'un clone ayant une mutation hétérozygote). Parmi ces 15 clones JOK-KO, 6 présentaient cette configuration homozygote, observable par la présence d'un profil de pics unique sur le chromatogramme d'électrophorèse capillaire (cf. **Figure 42**).

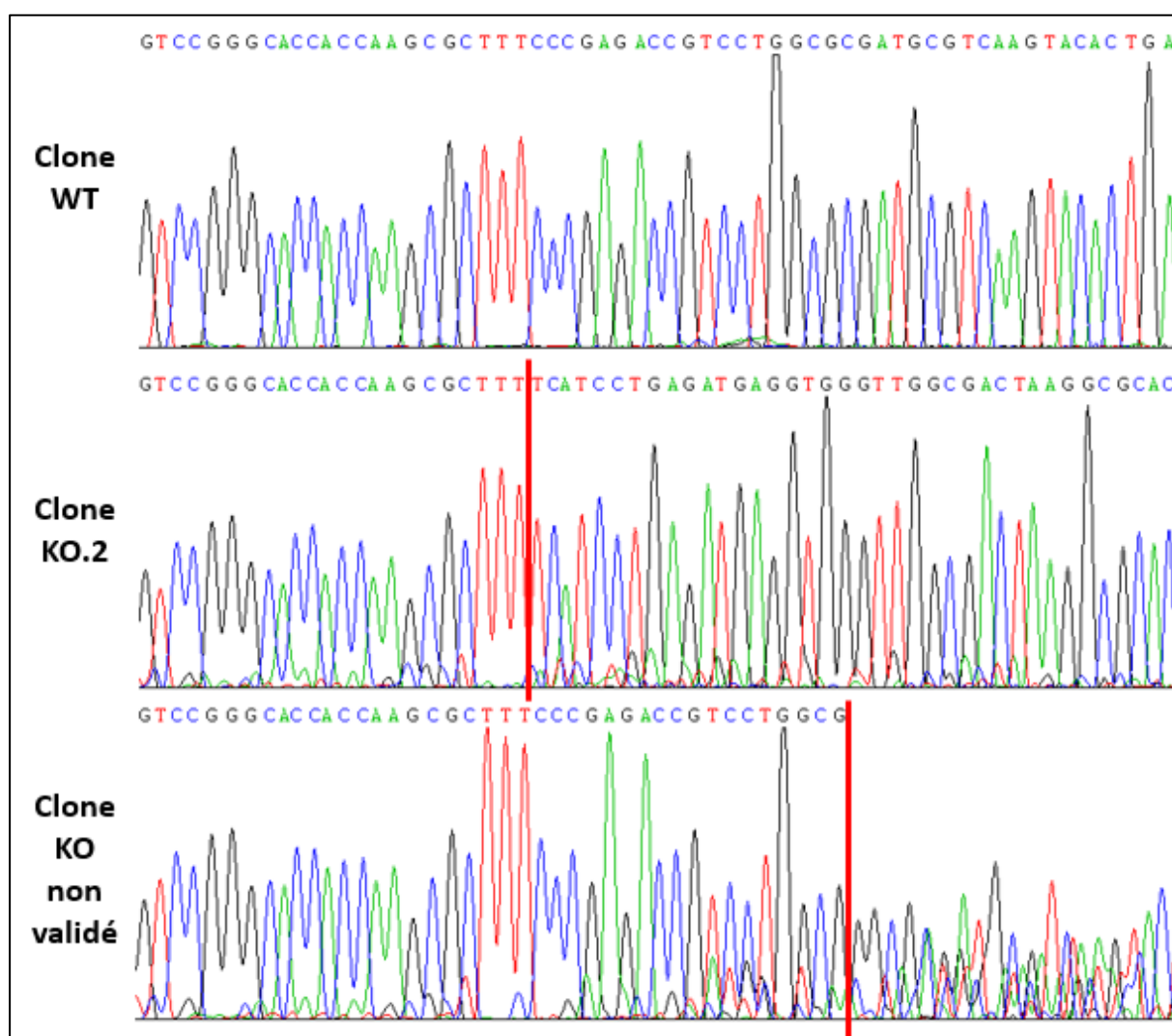


Figure 42 : Exemple de chromatogrammes d'électrophorèse capillaire d'un clone sauvage (WT), d'un clone JOK-KO homozygote (clone n°KO.2), et d'un clone non validé. Le trait rouge indique le début de la séquence mutée par rapport à la séquence sauvage du gène *CD38*. On observe sur le dernier électrophorégramme une superposition de pics à partir de ce trait.

L'analyse des chromatogrammes de ces clones KO homozygotes nous a permis de nous assurer que le décalage du cadre de lecture n'était pas d'un nombre de nucléotides multiple de 3 pour chacun d'entre eux. Un *frameshift* de 3 nucléotides ou d'un multiple de 3 nucléotides annulerait le décalage du cadre de lecture ouvert sur le gène, n'introduisant qu'une mutation localisée et conservant le reste de la séquence de la protéine CD38 intacte. Ainsi, le clone KO.1 présente une délétion de 77 nucléotides, le clone KO.2 une délétion de 41 nucléotides, les clones KO.3 et KO.4 une insertion de 4 nucléotides, le clone KO.5 une délétion de 6 nucléotides et une insertion de 13 nucléotides et le clone KO.6 une délétion de 173 nucléotides (cf. **Figure 43**).



Figure 43 : Alignement des séquences des 6 clones JOK-KO avec la séquence sauvage du gène *CD38* au niveau du point de cassure double brin. Les nucléotides **en bleu** sur la séquence *CD38* indiquent les sites de liaison des ZFN, les tirets rouges indiquent les nucléotides délétés, les séquences encadrées en vert indiquent les nucléotides insérés. La numérotation des nucléotides se réfère au site [+1] de la transcription. Le codon ATG initiateur de la traduction est situé en position [+76].

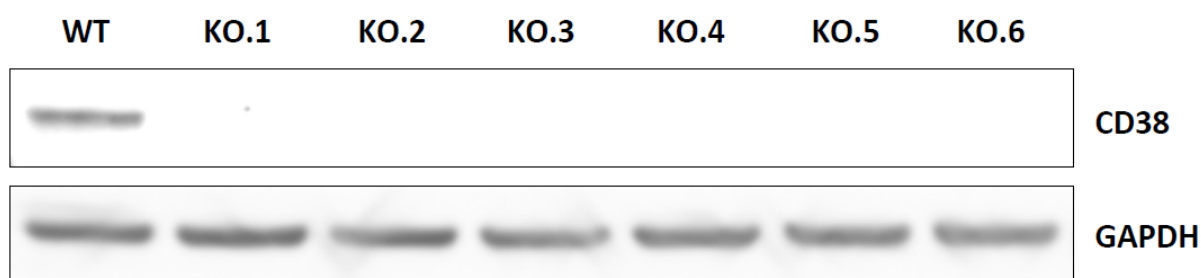
De même, les 6 clones WT-CD38 ont été séquencés et présentent une séquence native non mutée du gène *CD38*.

Pour chacun des clones KO, la structure du gène *CD38* est bien perturbée. Nous nous sommes ensuite assurés que malgré la rupture de la séquence nucléotidique du gène, une nouvelle protéine susceptible d'induire un biais dans notre étude n'était pas produite. En effet, la cassure ayant lieu au sein de l'exon 1, une protéine fusionnant les 49 premiers acides aminés de CD38 à une nouvelle séquence créée aléatoirement jusqu'à un codon STOP pourrait être générée. Notre analyse a confirmé la création de codons STOP précoces. Les

nouvelles séquences en acides aminés produites ne présentent aucune homologie significative avec d'autres protéines, et les domaines créés ne sont pas fonctionnels (cf. **Figure 44**). De plus, la production de telles protéines tronquées est hautement improbable, car le mécanisme NMD (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*) devrait entraîner la dégradation de ces ARNm erronés contenant de nombreux codons STOP aberrants. Ce mécanisme NMD participe à la surveillance des ARNm présentant des codons de terminaison de la traduction précoces (ou PTC pour *Premature-Termination Codon*), et diminue la synthèse de telles protéines tronquées en dégradant sélectivement ces ARNm [244].

Figure 44 : Recherche de protéines hypothétiques tronquées et potentiellement fonctionnelles après *genome editing* dans les clones JOK-KO. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été converties en séquences d'acides aminés grâce au logiciel ExPASy. L'intégralité des nouvelles séquences en AA « créées », seules ou juxtaposées à la séquence de 49 AA de CD38 située avant le point de cassure, a été criblée grâce au logiciel BLASTp. Aucun domaine fonctionnel n'a été détecté. La première glutamine (Q) de chaque séquence présentée correspond à l'AA n°49.

A.



B.

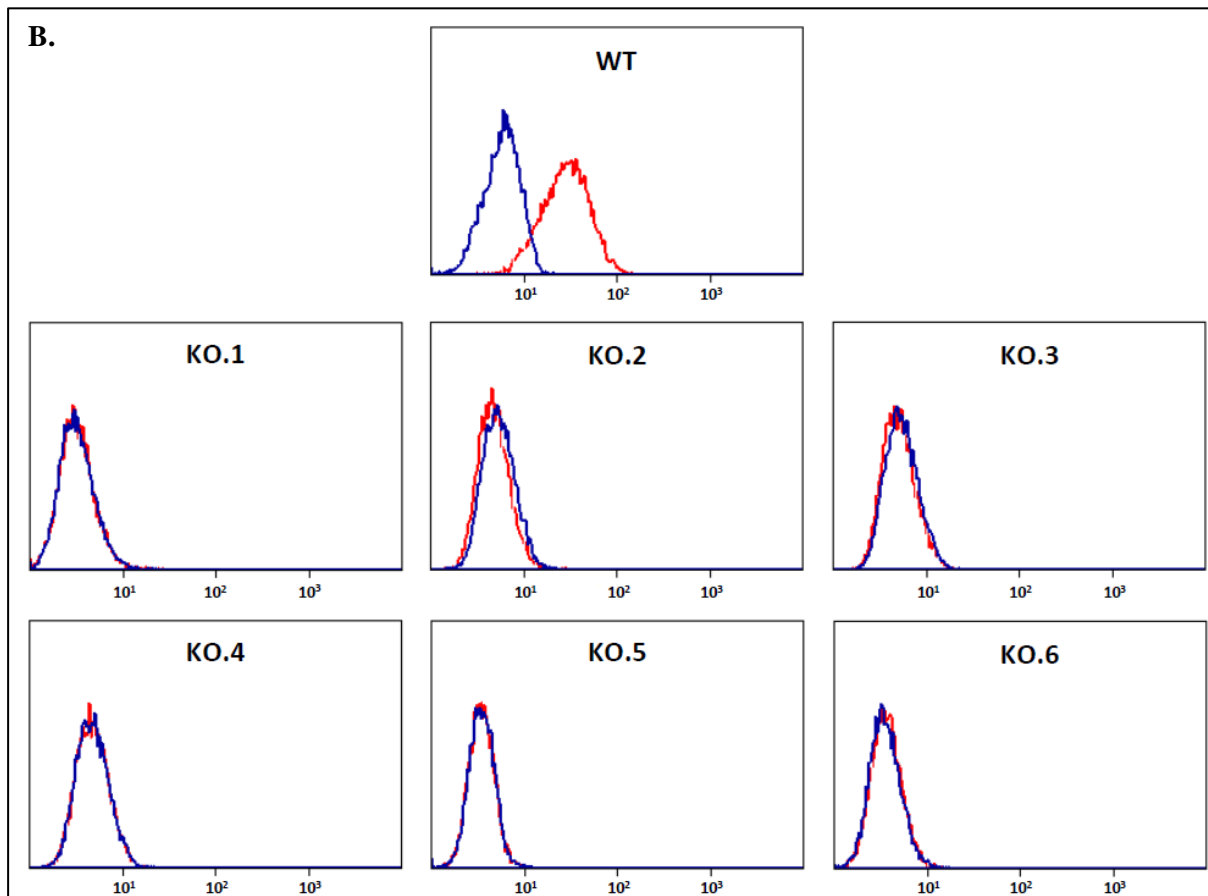


Figure 45 : A. Expression de la protéine CD38 totale dans chacun des clones JOK-KO comparés au mélange des 6 clones JOK-1 sauvages (WT). Un anticorps anti-GAPDH est utilisé comme témoin de charge. B. Analyse par cytométrie en flux de l'expression de surface de CD38 dans chacun des clones JOK-KO comparés au mélange des 6 clones JOK-1 sauvages (WT). **en bleu** : histogramme de l'anticorps isotype, **en rouge** : histogramme de l'anticorps anti-CD38. La fluorescence est indiquée en échelle logarithmique.

Nous sommes donc parvenus à produire un modèle cellulaire HCL invalidé pour l'expression de CD38 et entièrement validé. Afin de s'affranchir des biais dûs aux différences inter-clonales inhérentes au processus de génération des lignées, l'ensemble des expériences fonctionnelles qui suivront sur ce modèle JOK-WT / JOK-KO sera réalisé sur des cultures constituées d'un mélange initial en proportion équivalente des 6 clones KO d'une part, et d'un

même mélange de 6 clones WT d'autre part.

d. Validation de l'absence d'effets « OFF-Target »

Comme expliqué dans l'**Annexe 7**, les ZFNs sont conçus afin de maximiser leur spécificité d'action en évitant des coupures inappropriées sur des séquences d'ADN proches de celle ciblée par les protéines à doigts de zinc. La société Sigma Aldrich a ainsi conçu les ZFNs ciblant le gène *CD38* pour qu'il n'existe pas moins de 8 différences (*mismatches*) entre la séquence cible de *CD38* et ces séquences proches (appelées *OFF-Targets*). Cette société nous a fourni la liste des séquences *OFF-Targets* contenant le moins de *mismatches*. Afin de valider totalement notre modèle JOK-KO, nous avons analysé pour nos 6 clones JOK-KO les 4 séquences *OFF-Targets* présentant 8 ou 9 mismatches, par séquençage Sanger (cf. **Annexe 9** pour leur localisation dans le génome humain et les séquences des amorces utilisées). Ainsi, pour les 6 clones JOK-KO, aucune mutation par rapport aux clones JOK-WT n'a été décelée au niveau de ces séquences *OFF-Targets* potentielles, prouvant la spécificité de l'action des ZFNs et certifiant le lien de causalité entre l'invalidation de *CD38* et nos résultats d'études fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*.

e. Validation du KO du gène *CD38* dans de potentiels clones cellulaires HC-1

La même technique de *genome editing* a été réalisée dans la lignée HC-1. Cependant, nous avons rencontré des difficultés dans lors de l'établissement, puis de la validation des « clones » cellulaires HC-1-KO. En effet, cette lignée cellulaire présente la particularité d'avoir une très forte adhérence homotypique. Cette propension à adhérer a compliqué l'isolement de cellules uniques, que ce soit par dilution limite ou même avec le module d'*autocloning* du trieur cellulaire FACS Aria. Ainsi, il n'a pas été possible d'établir avec certitude la présence d'une cellule générant un clone cellulaire unique dans les puits de plaques 96-puits, par contrôle visuel après *autocloning*. De plus, cette lignée cellulaire croît difficilement lorsqu'elle est isolée à l'état de clone. Nous n'avons ainsi pu obtenir que 3 lignées cellulaires potentiellement clonales (3 « clones »).

L'analyse par séquençage de ces 3 lignées cellulaires HC-1-KO dans la région du gène *CD38* ciblée par les ZFN nous a révélé une superposition de pics sur les profils chromatographiques en électrophorèse capillaire (cf. **Figure 46**). Ceci peut s'expliquer par :

- la présence de plusieurs clones invalidés dans le puits d'intérêt

- l'hétérozygotie du gène *CD38*

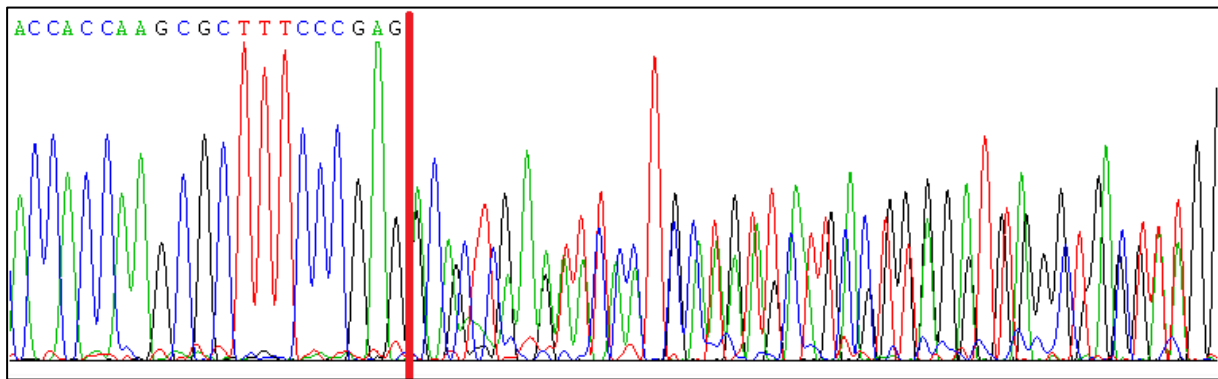


Figure 46 : Exemple de chromatogramme d'électrophorèse capillaire d'un potentiel clone HC-1-KO (clone n°1). Le trait rouge indique le début de la séquence mutée par rapport à la séquence sauvage du gène *CD38*. On observe une superposition de pics électrophorétiques à partir de ce nucléotide.

Cependant, l'étude des taux d'expression protéique par Western Blot et cytométrie en flux dans ces 3 « clones » KO a montré une extinction totale de l'expression de *CD38* (cf. **Figure 47, A. et B.**). L'invalidation de *CD38* est donc effective dans ces cellules, mais nous ne pouvons écarter avec certitude la possibilité d'une nouvelle expression de la protéine au cours de la culture, à partir d'un allèle du gène *CD38* resté intact. Certaines des expériences fonctionnelles réalisées sur la lignée JOK-KO seront réalisées sur ces cellules HC-1 KO. L'expression de *CD38* sera contrôlée par cytométrie en flux avant chaque expérience (de même que pour la lignée JOK-KO). Ces manipulations seront réalisées sur des cultures formées d'un mélange dans les mêmes proportions de ces 3 « clones » HC-1 KO, ainsi que d'un mélange de 3 « clones » HC-1 WT. Nous devons cependant garder à l'esprit l'imperfection de la validation de ce modèle.

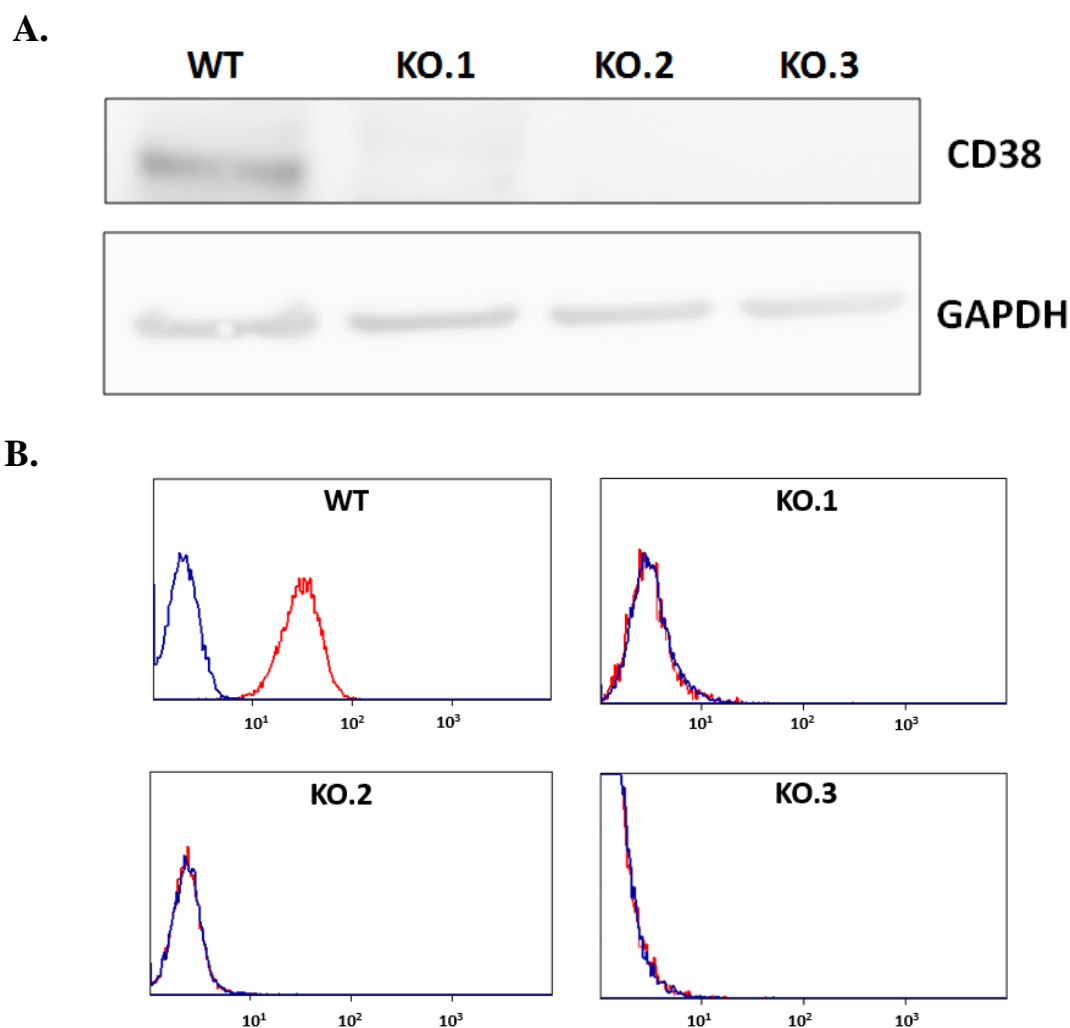


Figure 47 : A. Expression de la protéine CD38 totale dans les clones HC-1-KO comparés au mélange de clones HC-1 sauvage (WT). Un anticorps anti-GAPDH est utilisé comme témoin de charge. B. Analyse par cytométrie en flux de l'expression de surface de CD38 dans les clones HC-1-KO comparés à la lignée HC-1 sauvage (WT). **en bleu** : histogramme de l'anticorps isotype, **en rouge** : histogramme de l'anticorps anti-CD38. La fluorescence est indiquée en échelle logarithmique.

3. CD38 favorise la croissance des lignées cellulaires HCL *in vitro*

Nous avons tout d'abord cherché à savoir si CD38 était capable de modifier la vitesse de croissance des cultures cellulaires JOK-1 et HC-1 *in vitro*. Une cinétique effectuée sur 8 jours a montré une réduction significative de la croissance cellulaire de 21%, 32% et 36% aux jours 4, 6 et 8, respectivement, dans la lignée « JOK-KO » comparée à la lignée « JOK-WT » (cf. **Figure 48, A.**). La même manipulation montre une différence de croissance entre les lignées HC-1-WT et HC-1-KO plus faible, atteignant presque la significativité uniquement au jour 8 avec une moyenne de 24% de cellules en moins pour la « lignée » HC-1-KO (cf.

Figure 48, B.).

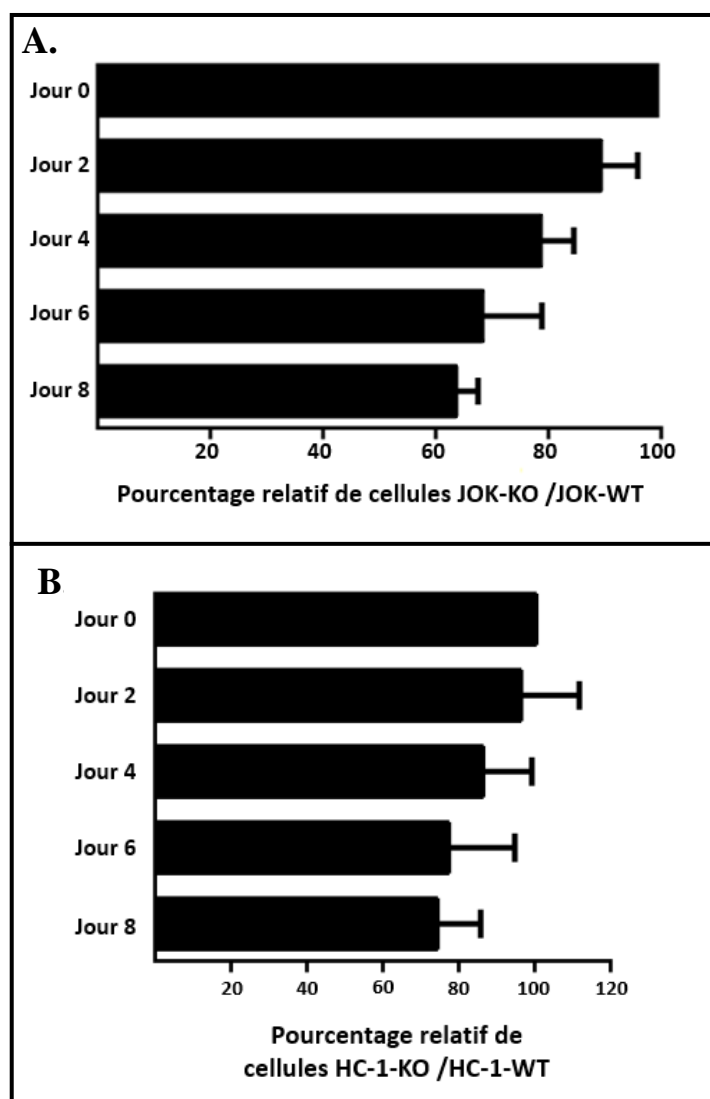


Figure 48 : A. Cinétique de croissance des cellules JOK-KO comparée aux cellules JOK-WT. Au jour 0, les cellules WT et KO sont inoculées en nombre égal dans le milieu de culture et comptées tous les 2 jours (cf. **Matériel et Méthodes p. 77**). Les barres représentent le pourcentage relatif de cellules JOK-KO / JOK-WT à un temps donné \pm l'écart-type. Les différences sont significatives pour les jours 4, 6 et 8 ($n=3$; Paired t-test : $p = 0,0257$; $0,0342$ et $0,0036$, respectivement).

B. Cinétique de croissance des cultures *in vitro* des cellules HC-1-KO comparée aux cellules HC-1-WT. Au jour 0, les cellules WT et KO sont inoculées en nombre égal dans le milieu de culture et comptées tous les 2 jours. Les barres représentent le pourcentage relatif de cellules HC-1 KO / HC-1 WT à un temps donné \pm l'écart-type. ($n=3$; Paired t-test : $p = 0,2034$; $0,1536$ et $0,0620$, respectivement).

4. CD38 ne modifie pas la prolifération des cellules HCL *in vitro*

La croissance cellulaire est une balance entre la capacité des cellules à proliférer et à survivre dans le milieu. CD38 a été décrit comme favorisant la prolifération des cellules B lymphoïdes matures, et l'inhibant chez les précurseurs B lymphoïdes [160], [162], [163], [167]. Nous avons donc étudié les propriétés prolifératives des cellules JOK-1 et HC-1 invalidées ou non pour l'expression de CD38, grâce à l'incorporation de l'EdU. Nous n'observons aucune différence dans le nombre de cellules JOK-WT ou JOK-KO proliférantes (environ 60%) (cf. **Figure 49**).

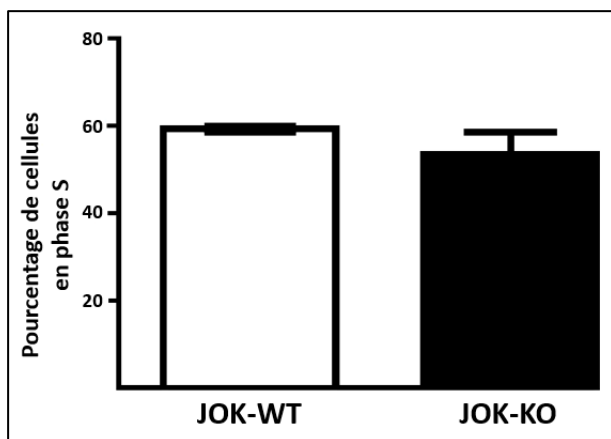


Figure 49 : Prolifération *in vitro* des cellules JOK-KO comparée à celle des cellules JOK-WT. Le pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire est déterminé par l'incorporation de l'EdU (cf. **Matériel et Méthodes p. 76**). Les barres représentent le pourcentage de cellules en phase S \pm l'écart-type. (n=3 ; Paired t-test : p = 0,157).

Une expérience identique précédée d'une stimulation par 200 ng/mL de LPS (LipoPolySaccharide) ou par 50 μ g/mL d'IgM, afin de stimuler la prolifération des cellules par induction des voies de signalisation du BCR, n'a pas non plus montré de différence entre les lignées JOK-WT et JOK-KO (données non montrées).

5. CD38 favorise la survie des cellules HCL

CD38 a également été décrit comme favorisant l'apoptose des lymphocytes B immatures et la survie des lymphocytes B matures [160], [162], [163], [167]. Nous avons donc étudié son influence sur la mort cellulaire dans nos modèles cellulaires KO pour ce gène. Ainsi, L'expression de CD38 favorise la survie des cellules JOK-1 en culture, dès 48 h et de manière significative après 72 h (cf. **Figure 50, A.**). De plus, ces observations sont confirmées dans le modèle HC-1-WT/HC-1-KO, où l'expression de CD38 augmente significativement la proportion de cellules A+/IP+ à 72 h (cf. **Figure 50, B.**).

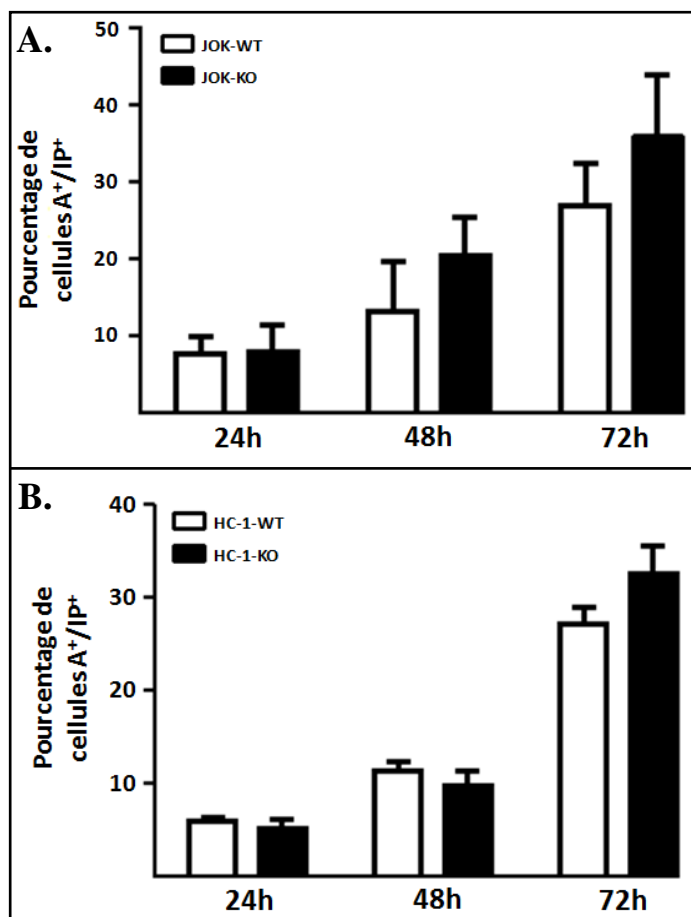


Figure 50 : A. Survie des cellules JOK-WT et JOK-KO *in vitro*. Les cellules sont incubées pendant 24 h, 48 h ou 72 h dans du milieu de culture complet puis la proportion de cellules Annexine V positives/ Iodure de Propidium positives (A^+/IP^+) est déterminée par cytométrie en flux (cf. **Matériel et Méthodes p76**). Les barres représentent le pourcentage de cellules $A^+/IP^+ \pm$ l'écart-type. (n=4 ; Paired t-test : $p = 0,2192$ et $0,0124$ à 48h et 72h, respectivement).

B. Survie des cellules HC-1-WT et HC-1-KO *in vitro*. Les cellules sont incubées pendant 24 h, 48 h ou 72 h dans du milieu de culture complet puis la proportion de cellules Annexine V positives/ Iodure de Propidium positives (A^+/IP^+) est déterminée par cytométrie en flux. Les barres représentent le pourcentage de cellules $A^+/IP^+ \pm$ l'écart-type. (n=3 ; Paired t-test : $p = 0,0419$ à 72 h).

Après induction de l'apoptose par l'IFN- α ou le TNF- α , nous n'avons observé aucune différence de survie cellulaire entre les conditions WT et KO (données non montrées).

6. CD38 ne modifie pas les flux calciques intracellulaires dans les cellules HCL

CD38 étant une ectoenzyme synthétisant des métabolites inducteurs de flux calciques, nous avons donc étudié si la modulation de son expression pouvait être associée à une perturbation des flux calciques intracellulaires dans l'HCL. Cette hypothèse nous semblait intéressante dans le contexte de cette pathologie où ces flux calciques sont exacerbés, ce qui favorise la survie des cellules [86]. Nous avons ainsi mesuré les taux de calcium par cytométrie en flux grâce au marqueur fluorescent ratiométrique Indo-1. Les cellules JOK-WT et JOK-KO présentent un niveau basal de flux calciques sensiblement le même (cf. **Figure 51**). L'ajout de NAD (substrat de CD38) dans le milieu n'a pas modifié l'intensité des flux calciques dans les 2 « lignées » cellulaires, sur des temps d'incubation courts (cf. **Figure 52**) ou longs allant jusqu'à 4 h (données non montrées). Les cellules répondent cependant à

l'induction des flux calciques, comme l'atteste la forte augmentation de ces flux par l'ajout de ionomycine dans le milieu (cf. **Figure 59**). Ces expériences ont été renouvelées dans le modèle HC-1 WT / HC-1 KO, avec des résultats identiques (données non montrées).

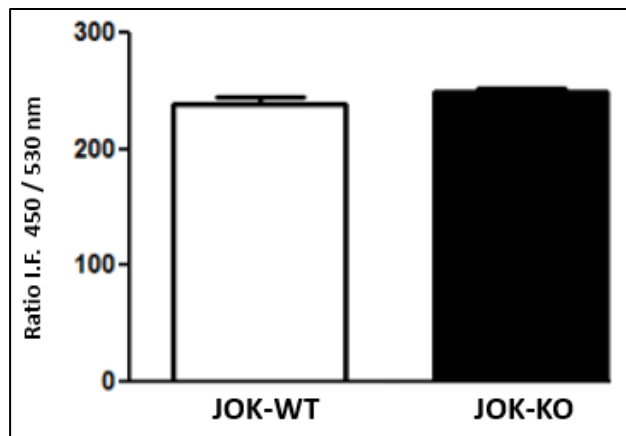


Figure 51 : Flux calciques intracellulaires dans les lignées JOK-WT et JOK-KO à l'état basal. La fluorescence des cellules incubées préalablement avec l'Indo-1 est mesurée pendant 5 min par cytométrie en flux (cf. **Matériel et Méthodes p. 77**). Les barres représentent la moyenne des ratios d'intensité de fluorescence à 450 nm sur celle à 530 nm \pm l'écart-type. (n=3).

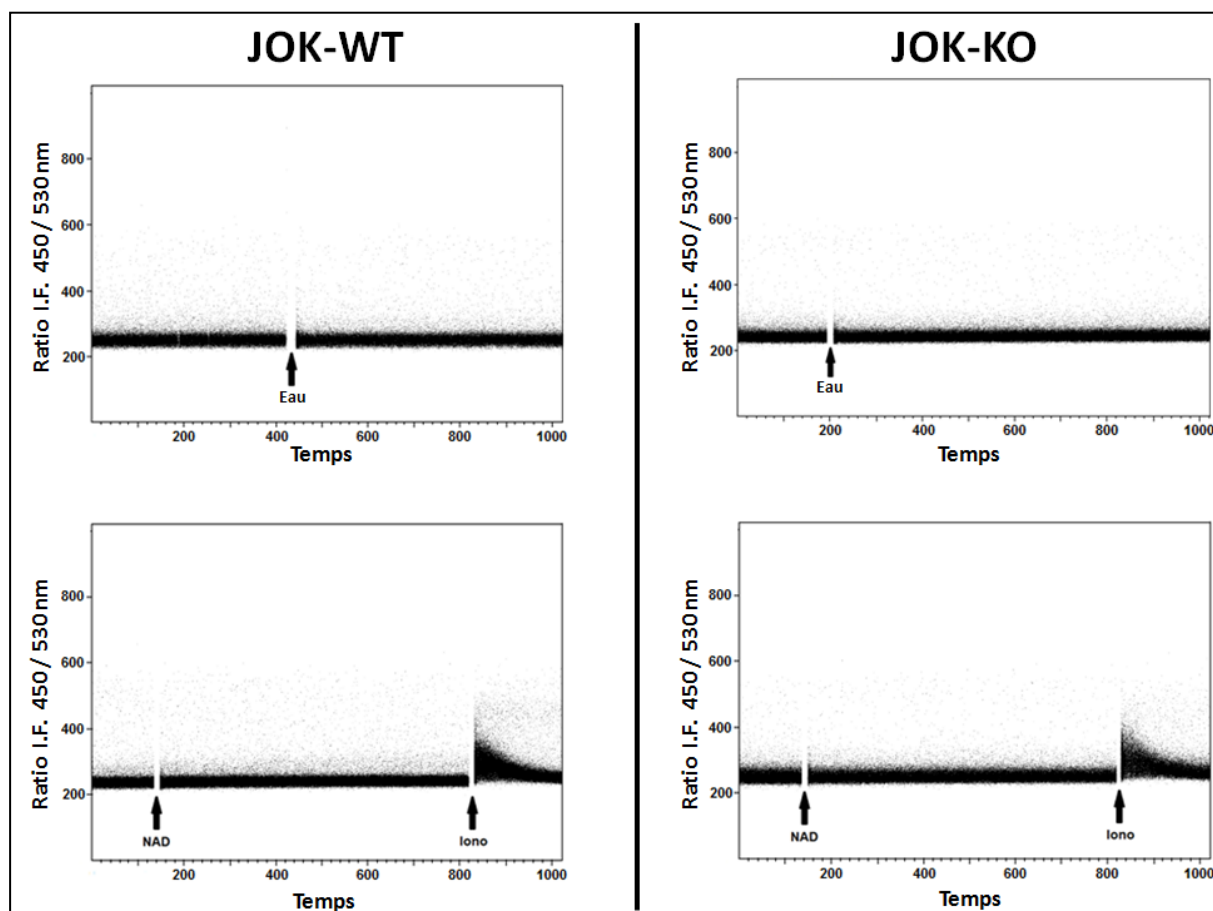


Figure 52 : Induction des flux calciques intracellulaires dans les « lignées » JOK-WT et JOK-KO. Les cellules préalablement incubées avec l'Indo-1 sont analysées au cytomètre pendant 3 min pour établir la ligne de base. 100 μ M de NAD sont ensuite ajoutés au milieu et l'acquisition est poursuivie pendant 10 min. Afin de vérifier la sensibilité des cellules à l'induction de flux calcique, de la ionomycine (0,5 μ M finale) est ajoutée au même mélange de cellules comme témoin positif. Les flèches noires indiquent l'ajout d'un réactif. Le temps n'est pas indiqué en secondes mais selon une unité arbitraire propre au logiciel d'analyse.

7. CD38 favorise l'adhérence à l'endothélium *in vitro*

Par ses interactions avec son récepteur-ligand CD31, la protéine CD38 a été décrite comme une molécule d'adhérence aux cellules endothéliales, exprimant CD31 à leur surface. Son implication dans l'adhérence à l'endothélium des lymphocytes T et des cellules de LLC a été prouvée précédemment [222], [245]. De plus, la surexpression de RhoH dans la lignée JOK-1 a conduit à une diminution des capacités adhésives des cellules qui pourrait être due en partie à la répression de CD38 induite dans ces conditions [110].

Nous avons donc voulu déterminer si CD38 pouvait jouer un rôle dans l'adhérence des tricholeucocytes à l'endothélium, phénomène essentiel à la dissémination des cellules leucémiques dans l'organisme. Les cellules JOK-WT et JOK-KO ont été mises en contact de tapis cellulaires confluents de la lignée d'endothélium microvasculaire HMEC-1, activée ou non par le LPS. Nous avons ainsi observé une diminution de l'adhérence hétérotypique de 34% sur les tapis cellulaires endothéliaux HMEC-1 non activés et de 39% sur les tapis cellulaires HMEC-1 activés, lorsque l'expression de CD38 est annihilée (cf. **Figure 53**).

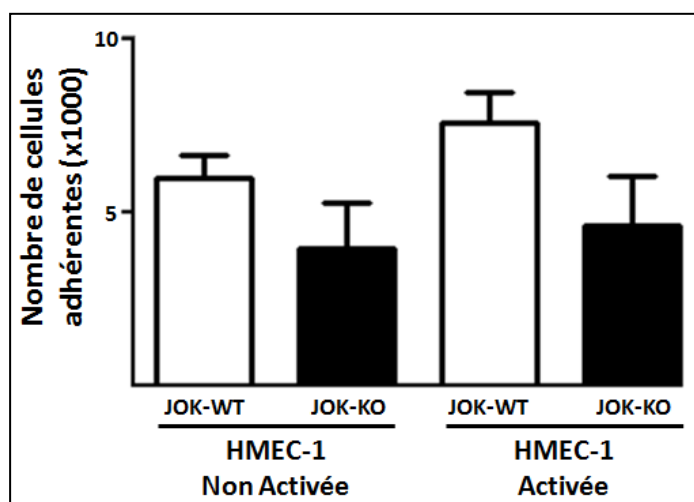


Figure 53 : Adhérence à l'endothélium des cellules JOK-WT et JOK-KO. Après avoir incorporé la fluorescence par incubation avec le BCECF-AM, les cellules sont mises en contact de tapis cellulaires endothéliaux HMEC-1 à confluence, pendant une heure à l'étuve en plaque 96 puits. Les puits sont lavés et la fluorescence à 535 nm est mesurée (cf. **Matériel et Méthodes p. 75**). Les barres représentent la moyenne du nombre de cellules ayant adhéré à ces tapis endothéliaux \pm l'écart-type. (n=4 ; Paired t-test : p = 0,0332 et 0,0126 pour les cellules non activées et activées, respectivement). Données produites avec la collaboration de Sylvie Galiègue-Zouitina.

L'adhérence au stroma médullaire pouvant être une cause de la forte propension des cellules HCL à rester ancrées à leur niche médullaire, pouvant potentiellement y entretenir une MRD (cf. **Introduction p.11 à 13**), la question de l'éventuelle implication de CD38 dans l'adhérence aux cellules stromales médullaires semble également être d'un intérêt majeur. Nous avons donc réitéré les expériences précédentes sur des tapis cellulaires de la lignée de stroma médullaire humain HS-5. Bien que l'adhérence des cellules JOK-1 aux tapis de cellules stromales soit supérieure (en valeur absolue) à celle observée sur tapis cellulaires

endothéliaux, CD38 ne semble pas modifier de manière significative l'adhérence des cellules de notre modèle JOK-1 +/- CD38 au stroma médullaire *in vitro* (cf. **Figure 54**). Ceci pourrait s'expliquer par une expression de CD31 nulle dans la lignée HS-5 alors que la lignée HMEC-1 l'exprime de manière notable (cf. **Figure 55**).

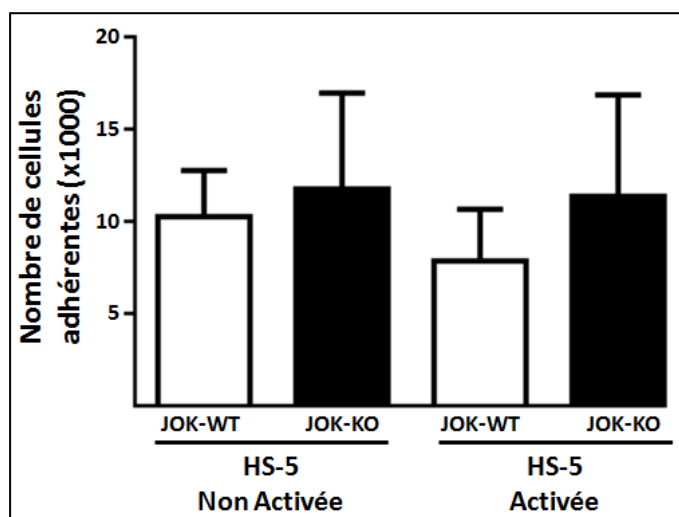


Figure 54 : Adhérence au stroma médullaire des cellules JOK-WT et JOK-KO. Les cellules sont mises en contact de tapis de cellules stromales HS-5 confluentes, pendant une heure à l'étuve en plaque 96 puits. Les puits sont lavés et la fluorescence à 535 nm est mesurée (cf **Matériel et Méthodes p. 75**). Les barres représentent la moyenne du nombre de cellules ayant adhéré \pm l'écart-type. (n=4 ; Paired t-test : p = 0,4327 et 0,2575 pour les tapis non activés et activés, respectivement).

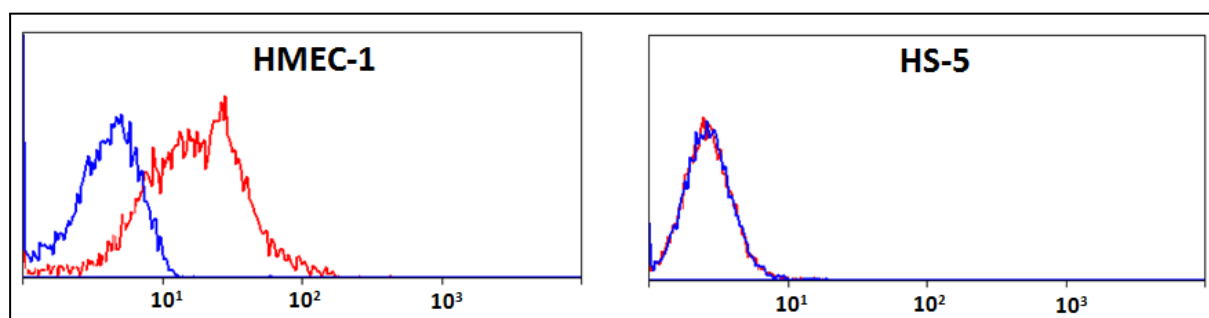


Figure 55 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de surface de CD31 dans les lignées cellulaires HMEC-1 et HS-5. **en bleu** : histogramme de l'anticorps isotype, **en rouge** : histogramme de l'anticorps anti-CD31. La fluorescence est indiquée en échelle logarithmique.

8. CD38 module la migration transendothéliale *in vitro*

Si l'adhérence des cellules à l'endothélium constitue la première étape nécessaire à la dissémination des cellules leucémiques dans la circulation sanguine, la seconde étape cruciale est l'extravasation des cellules à travers la paroi de cellules endothéliales. Nous avons voulu évaluer l'impact de CD38 sur cette migration transendothéliale dans notre modèle JOK-WT/JOK-KO. En effet, la reconstitution de l'expression de RhoH dans la lignée JOK-1 a conduit à une diminution du potentiel de migration trans-endothéliale de ces cellules [110].

Les cellules JOK-WT et JOK-KO ont été mises en contact avec des tapis cellulaires

endothéliaux HMEC-1 générés en chambre de migration (« *Transwells* »), puis laissées adhérer pendant 8h et ensuite migrer durant 16h vers le compartiment inférieur des chambres, avant numération des cellules ayant migré à travers les tapis endothéliaux. Nous avons alors observé que les cellules JOK-WT migraient moins à travers les tapis endothéliaux que les cellules JOK-KO (cf. **Figure 56**).

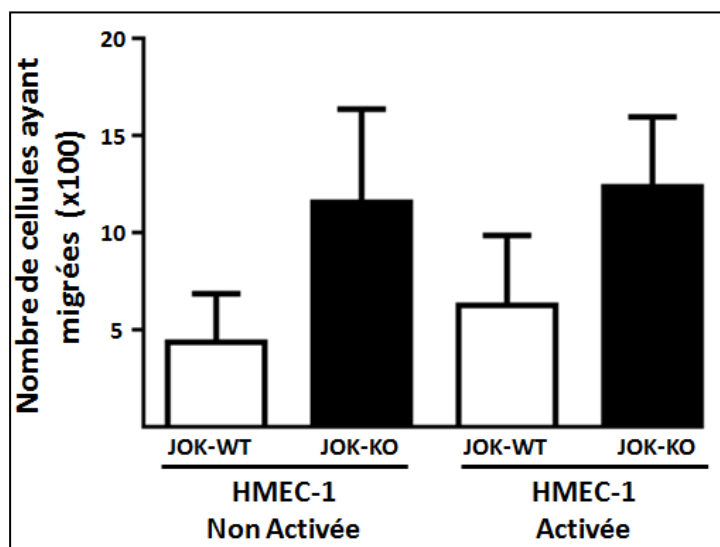


Figure 56 : Migration transendothéliale des cellules JOK-WT et JOK-KO. Les cellules sont mises en contact de tapis de cellules endothéliales HMEC-1 confluentes activés ou non par le LPS, puis incubées à 37°C pendant 8 h (adhérence) et ensuite pendant 16 h (migration). Les cellules sont comptées dans les chambres migratoires (compartiments inférieurs) (cf. **Matériel et Méthodes p. 75-76**). Les barres représentent la moyenne du nombre de cellules ayant migré à travers les tapis cellulaires endothéliaux \pm l'écart-type. (n=7 ; Paired t-test : p = 0,0011 et 0,0108 pour les cellules HMEC-1 non activées et activées, respectivement). Données produites avec la collaboration de Sylvie Galiègue-Zouitina.

9. CD38 favorise la progression tumorale *in vivo*

Les résultats précédents nous ont montré que CD38 est capable de promouvoir la croissance des cellules leucémiques HCL, en augmentant leur résistance à l'apoptose, et favorise leur adhérence à l'endothélium *in vitro*. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de CD38 dans la progression de la pathologie *in vivo*. Nous avons donc poursuivi notre étude en réalisant des xénogreffes de cellules JOK-WT et JOK-KO dans un modèle murin immunodéficient NSG (NOD-SCID Gamma). Les premières expériences ont été réalisées par injection intrapéritonéale des cellules et montraient une tendance au développement de tumeurs de taille plus faible dans la cavité péritonéale lors de l'injection des cellules JOK-KO que celles obtenues lors de l'injection des cellules JOK-WT (cf. **Figure 57, A.**). Cependant, ces résultats n'aboutissaient pas à une différence significative entre les deux conditions. Ceci pouvait être dû à la mauvaise encapsulation des tumeurs, aboutissant à une délimitation difficile de celles-ci lors des dissections ; d'autre part nous avons parfois constaté un développement de plusieurs tumeurs adjacentes et difficilement séparables des organes (cf.

Figure 57, B.). Tout ceci a abouti finalement à un biais et à une disparité dans l'analyse pondérale de ces tumeurs.

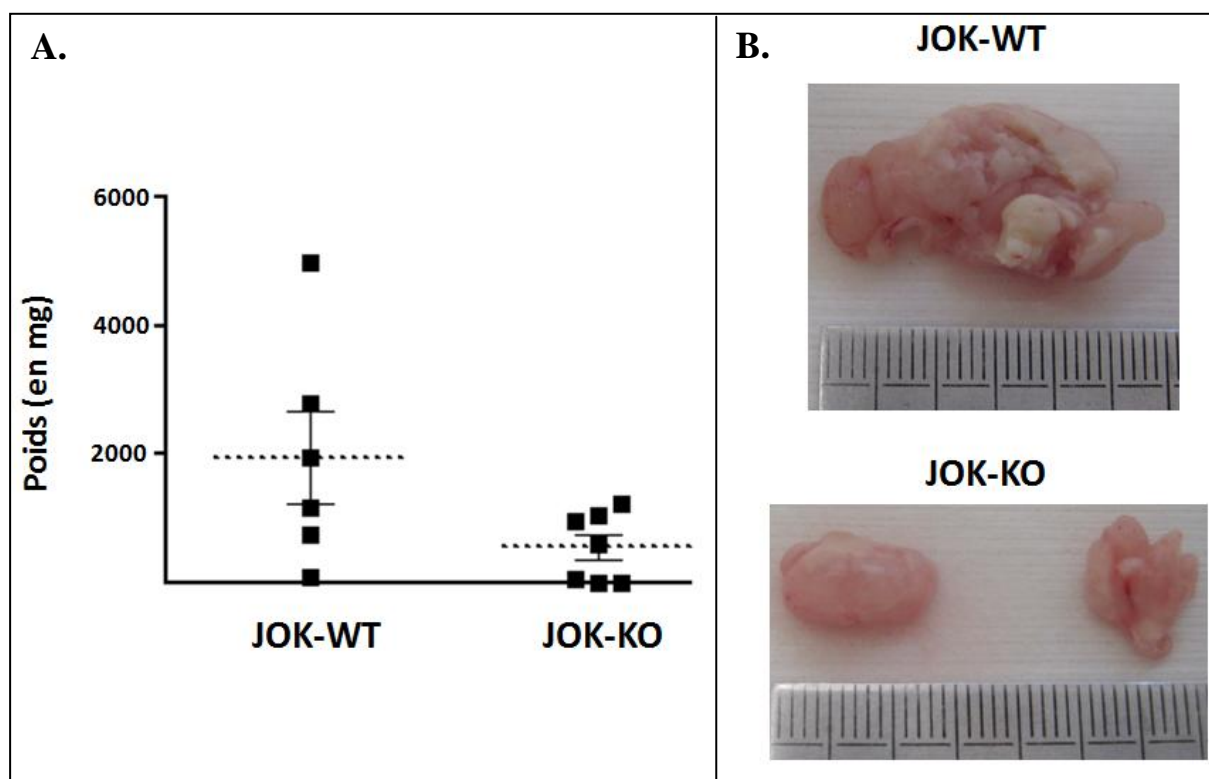


Figure 57 : Développement de tumeurs *in vivo* suite à des xénogreffes par injection intrapéritonéale des cellules JOK-WT et JOK-KO chez la souris NSG. Les injections intrapéritonéales de $10 \cdot 10^6$ cellules ont été réalisées chez des souris mâles et femelles âgées de 6 à 8 semaines. Après 4 semaines, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs disséquées et pesées. **A. Diagramme des poids des tumeurs.** Chaque tumeur est représentée par un carré (6 souris « WT » et 7 souris « KO »). Les lignes horizontales en pointillés représentent la moyenne des mesures et les barres verticales représentent l'écart-type. (Unpaired t-test : $p = 0.0734$). **B : Exemples de photographies de tumeurs.** On remarque les formes irrégulières mal encapsulées ou plusieurs tumeurs issues d'une seule injection témoignant d'un défaut d'encapsulation. Données produites avec la collaboration de Soizic Guihard.

Afin de résoudre ce problème de dispersion des résultats nous empêchant de conclure, nous avons réalisé des injections sous-cutanées des cellules JOK-WT ou JOK-KO dans le même modèle murin. Les tumeurs issues des cellules JOK-WT ont alors également montré une taille et un poids supérieurs à celles issues des cellules JOK-KO (cf. **Figure 58, A.**). Leur différence de croissance des tumeurs est ici significative, certainement du fait d'une meilleure encapsulation de ces tumeurs sous la peau, celles-ci présentant ainsi une forme ellipsoïde plus régulière (cf. **Figure 58, B.**).

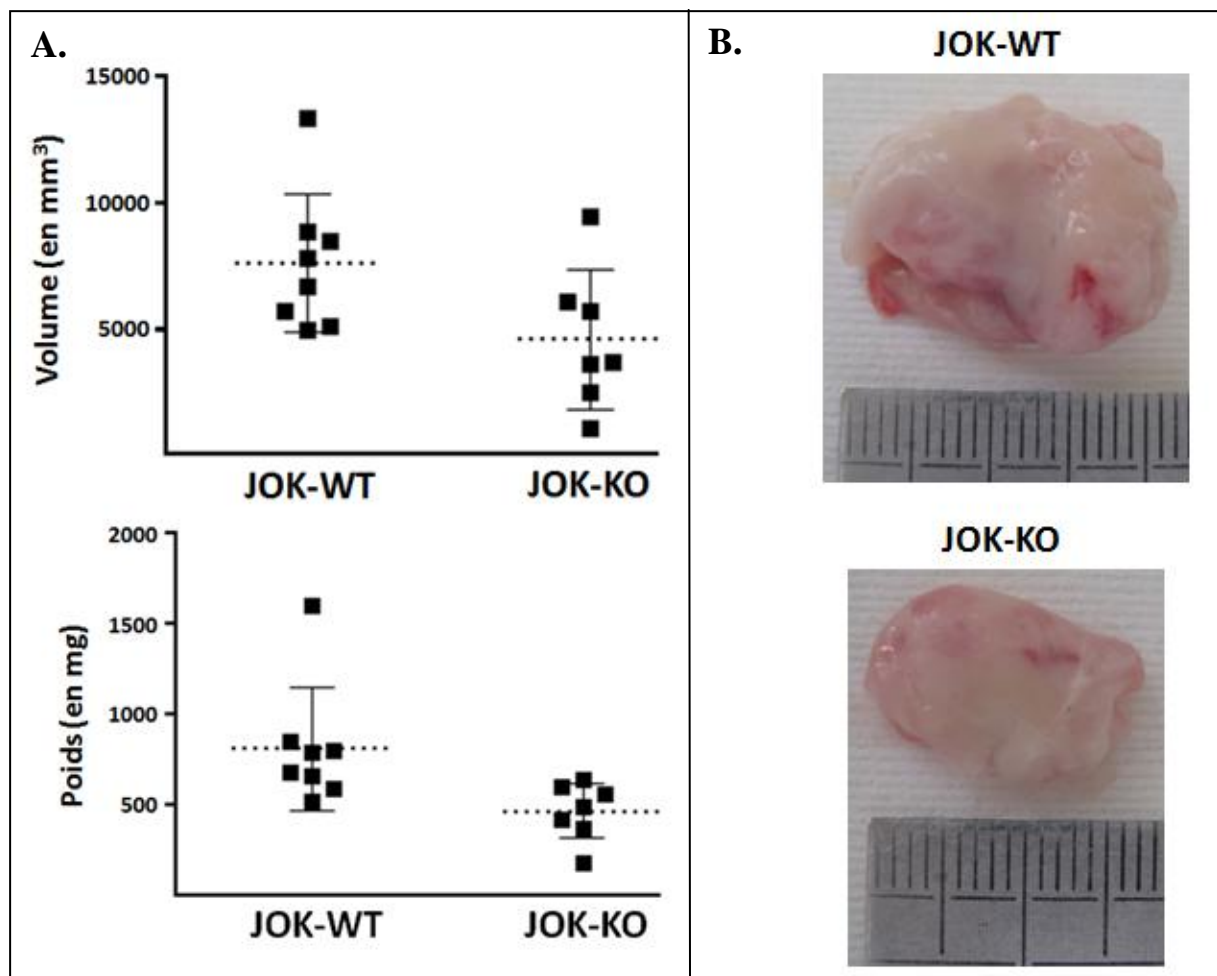


Figure 58 : Développement de tumeurs *in vivo* suite à des xénogreffes par injection sous cutanée des cellules JOK-WT et JOK-KO chez la souris NSG. Les injections sous-cutanées de 5.10^6 cellules ont été réalisées chez des souris mâles et femelles âgées de 6 à 8 semaines. Après 4 semaines, les souris sont sacrifiées et les tumeurs sont disséquées et pesées. **A. Diagramme des volumes et poids des tumeurs.** Chaque tumeur est représentée par un carré (8 souris « WT » et 7 souris « KO »). Les lignes horizontales en pointillés représentent la moyenne des mesures et les barres verticales représentent l'écart-type. (Unpaired t-test : $p = 0.0525$ et $p = 0.0273$ pour les volumes et les poids, respectivement). **B. Exemples de photographies de tumeurs.** Les tumeurs sont ici monolobées et de forme plus régulière. Données produites avec la collaboration de Soizic Guihard.

Les cellules de certaines tumeurs ont été analysées par cytométrie en flux après leur dissection, afin de confirmer l'absence de cellules murines pouvant biaiser nos résultats. Elles ont été marquées par des anticorps anti-CD45 humain et murin (afin de faire la distinction entre les cellules tumorales humaines et les cellules de la souris hôte), et également par un anticorps anti-CD19 humain. La proportion de cellules humaines au sein des tumeurs a toujours été supérieure à 98% dans nos échantillons, prouvant l'absence de contamination de nos prélèvements.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La leucémie à tricholeucocytes est une hémopathie maligne pour laquelle l'arsenal thérapeutique de première ligne est particulièrement efficace. En effet, l'utilisation des analogues de purines (pentostatine et cladribine) dès le début des années 1990 a révolutionné le traitement de cette leucémie, en atteignant des taux de rémission complète de l'ordre de 95%. Cet état de fait place l'HCL parmi les cancers les mieux traités, mais en fait également un modèle intéressant pour étudier un mécanisme biologique encore méconnu : la récurrence. En effet, malgré l'efficacité des traitements par analogue de purines, une fraction importante des patients rechutera (48% des patients contracteront une récurrence dont l'incidence augmentera avec le temps) [34]. La recherche se concentre désormais sur la mise au point de thérapies ciblées (inhibiteurs de BRAF V600E, de Mek1, de Btk, anticorps monoclonaux ciblant le CD20...) visant à éradiquer les dernières cellules leucémiques ou à traiter les patients réfractaires aux traitements de référence [2]. Cependant, des patients montrent déjà des résistances pour ces thérapies innovantes et l'effort de recherche de nouvelles thérapies doit être maintenu [57].

Ce travail doctoral visait à mieux comprendre le rôle fonctionnel de la protéine RhoH, sous-exprimée dans l'HCL et contrecarrant la progression de cette leucémie [110]. Pour se faire, nous nous sommes intéressés à une protéine réprimée par RhoH dans la tricholeucocytose, CD38, dont nous avons étudié la régulation par RhoH ainsi que son impact fonctionnel sur le développement de la leucémie.

La protéine CD38 est déjà connue pour être un acteur clef du développement lymphocytaire B. A la fois un récepteur de surface, une ectoenzyme et une molécule d'adhérence, elle participe aux phénomènes d'apoptose et d'arrêt de prolifération des précurseurs B nécessaires à leur sélection et leur différenciation ainsi qu'à la survie et la prolifération des lymphocytes B matures, permettant leur expansion clonale lors de la réponse à l'antigène [159], [162], [163]. CD38 est également important pour la migration de ces cellules B [180]–[182]. De plus, son implication dans la progression de la LLC ainsi que l'activité thérapeutique des anticorps monoclonaux le ciblant dans le traitement du myélome multiple suggèrent la question de son rôle dans d'autres leucémies des lymphocytes B différenciés. Ce rôle prépondérant dans la lymphopoïèse et la leucémogénèse B en font un objet d'étude intéressant dans l'HCL, car inexploré dans cette leucémie B.

1. Etude de la régulation de l'expression du gène *CD38* par RhoH

L'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *CD38* a été peu décrite dans les lymphocytes B. Seules quelques équipes se sont intéressées aux éléments *cis* présents au début de l'intron 1 de ce gène. Cependant, les nombreux sites de fixation de facteurs de transcription de la partie 5' génomique proximale du gène *CD38*, démontrés comme actifs dans d'autres modèles, n'ont jamais été étudiés dans ces cellules. Ce manque de connaissance sur la régulation de l'expression d'une protéine essentielle au développement des lymphocytes B ajoute de l'intérêt à nos travaux, du point de vue de la recherche fondamentale.

De plus, l'étude des mécanismes de régulation de *CD38* par RhoH visait à étendre la liste des effets de cette petite protéine G dans l'HCL, afin de dégager de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles liées à ses effets onco-protecteurs.

La première partie de notre travail a consisté en l'étude de ces mécanismes de régulation. Nous avons confirmé les données transcriptomiques montrant cette répression de *CD38* par RhoH au niveau des ARNm et de la protéine *CD38*. L'étude de l'activité promotrice du gène *CD38* dans notre modèle JOK-E/JOK-R n'a pas révélé de différence significative selon la surexpression ou non de RhoH. Cependant, dans ce modèle, une stimulation par l'ATRA augmente l'expression de *CD38*, contrecarrant ainsi sa répression par RhoH. L'ATRA permet donc de lever partiellement l'inhibition de l'expression de *CD38* par RhoH, cette expression atteignant son niveau « maximal » dans la lignée JOK-R. Le récepteur nucléaire RAR- α ne semble donc pas activé de manière constitutive dans la lignée JOK-1 mais son action sur l'activité promotrice de *CD38* est indépendante de RhoH. Nos expériences ont cependant montré une forte activité de la construction S dans notre modèle d'HCL et mis en évidence que la présence des éléments de régulation du début de l'intron 1 (dont l'élément RARE) n'était pas suffisante à l'induction d'une activité promotrice significative. Ceci laisse présager la présence d'une région promotrice activatrice minimale dans les 1300 premiers nucléotides de la partie 5' génomique du gène *CD38*.

En parallèle de notre hypothèse initiale d'une régulation transcriptionnelle de *CD38* par RhoH, nous avons envisagé l'implication de phénomènes post-transcriptionnels, cette hypothèse étant plausible d'après les données de la littérature [142], [143] et après vérification

de la présence d'éléments *cis* dans la partie 3'UTR de l'ARNm *CD38*. La stabilité des ARNm *CD38* semble être diminuée par la protéine RhoH, cependant ceci reste à discuter : en effet, l'étude de la stabilité des ARNm par q-RT-PCR n'est pas la meilleure méthode et nos résultats manquaient de puissance statistique. De plus, nous n'avons pas réussi à déterminer si l'action d'un miR ou d'une protéine se liant aux ARNm *CD38* pouvait être à l'origine de ce phénomène.

Un effort supplémentaire devrait être fait afin de réaliser la mise au point de la technique de *run-off* et de trancher sur la question d'une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle de *CD38* par RhoH dans ce modèle d'HCL. La possibilité d'une intervention de phénomènes « à longue distance » dus à la liaison de facteurs de transcription sur l'ADN peut également être envisagée. Ces mécanismes « à longue distance » (*Long Range Interactions*) ont lieu lorsque la fixation d'un facteur de transcription sur l'ADN induit un réarrangement de la structure de la chromatine et un repliement de l'ADN par interaction avec une autre protéine de remodelage de la chromatine, rapprochant des zones du génome normalement très éloignées. Ainsi, Smad1 ou d'autres facteurs de transcription modulés par RhoH (selon les données du transcriptome) tels Sox4 pourraient participer à ces phénomènes « à longue distance ». De plus, *TAF2* (gène codant une protéine du complexe de la RNA pol II) serait réprimé d'un facteur 1,63 par RhoH d'après les données du transcriptome, et les membres de la famille TAF sont impliqués dans ces *Long Range Interactions* [246]. Dans ce cas de figure, la transfection transitoire de nos constructions plasmidiques du promoteur de *CD38* ne peut pas nous permettre de détecter ces interactions, car l'ADN exogène n'est pas intégré à la chromatine. Pour pouvoir les étudier, une transfection stable de ces constructions plasmidiques serait nécessaire, ainsi que l'utilisation de nouvelles techniques [PCR conformationnelle 3C (*Chromosome Conformation Capture*)...] [247].

L'analyse des données du transcriptome nous a conduit à considérer la surexpression du gène *SMAD1* dans la lignée JOK-R, concomitante à la répression du gène *CD38*, les deux phénomènes étant du même ordre de grandeur. Une analyse bioinformatique a montré la présence de SBE sur le promoteur de *CD38*, renforçant la possibilité d'une régulation de l'expression de *CD38* par RhoH via la protéine Smad1. La surexpression de Smad1 par transfection transitoire dans la lignée JOK-1 n'a pas induit de modulation des taux d'expression des ARNm *CD38*, or une diminution notable de l'activité de son promoteur a été observée. Cette absence de lien entre activité promotrice et taux de transcrits pourrait être due

à la transfection transitoire, l'expression de Smad1 étant induite fortement, mais sur un temps très court. On a ainsi une perte de la majorité des plasmides transfectés 48 h après transfection. Cette forte induction d'expression du facteur Smad1 pourrait permettre d'observer des phénomènes précoces dans la transcription (telle la fixation de Smad1 suivie d'une variation de production de la luciférase) mais pas des phénomènes plus tardifs (comme la diminution des transcrits *CD38* totaux, résultant d'un équilibre entre néobiosynthèse et dégradation des ARNm). Cette hypothèse est d'ailleurs confortée par la grande stabilité des ARNm *CD38*, pouvant masquer les effets de la répression de la transcription : suite à la surexpression transitoire de Smad1, le taux d'ARNm *CD38* resterait ainsi inchangé pendant une longue période de temps.

L'étude de la fixation effective de Smad1 *in cellulo* sur les SBE potentiels du promoteur de *CD38* par ChIP (*Chromatin ImmunoPrecipitation*) nous permettrait d'avancer sur cette question. De plus, la transfection stable du vecteur d'expression de Smad1 dans la lignée JOK-1 conduirait à une expression continue dans le temps permettant peut-être de visualiser la diminution des transcrits *CD38*.

Nos résultats restent cependant lacunaires et une étude plus approfondie de ce mécanisme de régulation serait nécessaire. Elle pourrait aboutir à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques d'intérêt dans l'HCL.

2. CD38 favorise la progression tumorale de l'HCL

La seconde partie de notre étude visait à étudier l'impact fonctionnel de la protéine CD38 dans l'HCL. Cette étude s'inscrit dans le cadre plus large de la compréhension des effets de RhoH dans cette pathologie. RhoH est sous-exprimée dans cette leucémie, et la reconstitution de son expression dans le modèle cellulaire JOK-1 a conduit à une diminution de la croissance cellulaire, des propriétés adhésives et migratoires *in vitro* ainsi qu'à une diminution de la progression tumorale *in vivo*. La forte diminution d'expression de *CD38* induite par RhoH nous a donc laissé penser à un rôle actif de CD38 dans la pathologie.

Nous avons tout d'abord observé une hétérogénéité d'expression de CD38 dans un panel de lignées cellulaires HCL. Cette hétérogénéité est en accord avec le taux d'expression observé par une étude suédoise [227] et tout récemment par nos collaborateurs, la proportion de patients HCL exprimant CD38 étant de l'ordre de 1/3 dans une série de 43 patients HCL

(données produites par le Pr Xavier Troussard) [248].

Nous avons par la suite produit des modèles cellulaires HCL KO pour l'expression du gène *CD38* grâce à une technique de *genome editing* et validés pour cette délétion. Cet outil nous a tout d'abord permis de montrer que *CD38* gouvernait la croissance cellulaire. En comparant ces données à celles obtenues suite à la surexpression de *RhoH* dans ces mêmes cellules [110], on remarque dans l'étude de 2008 une différence de croissance plus marquée entre cellules surexprimant *RhoH* (JOK-R) ou non (JOK-E) qu'entre cellules JOK-1 KO pour *CD38* et cellules sauvages (WT) dans notre étude. On peut en déduire que *CD38* participe au phénomène de diminution de croissance induit par *RhoH*, mais que d'autres protéines modulées par celle-ci sont certainement impliquées. Ainsi, l'observation des données du transcriptome nous montre que certains gènes liés à la prolifération ou à l'apoptose sont modulés par *RhoH*, ce qui pourrait expliquer cette différence de croissance (cf. **Annexe 10**). Par exemple, concernant les phénomènes de prolifération, le gène *GAS7*, codant une protéine favorisant un arrêt du cycle cellulaire [249], est surexprimé d'un facteur 5,4 dans la lignée JOK-R. *Smad1* a quant à lui été décrit comme régulateur négatif de la prolifération cellulaire neuronale [250]. De plus, le gène codant le régulateur transcriptionnel *Meis1* est réprimé d'un facteur 1,6 dans la lignée JOK-R. Cette protéine est connue pour promouvoir la prolifération des cellules de LAM, en potentialisant l'effet leucémogène du facteur de transcription *HoxA9* [251]. Le gène *CSF1R*, codant le récepteur au CSF (*macrophage Colony-Stimulating Factor*) est lui aussi réprimé, d'un facteur 3. Ce récepteur favorise la multiplication des cellules myéloïdes et de cancer du sein [252], [253]. Concernant les voies d'apoptose, le gène *HRK*, codant l'activateur d'apoptose Harakiri [254], est lui surexprimé d'un facteur 2,1. Enfin, celui codant la protéine BMF (*Bcl-2 Modifying Factor*) est surexprimé d'un facteur 1,5. BMF, en s'associant avec le facteur anti-apoptotique *Bcl-2*, l'inactive et induit l'apoptose [255].

CD38 promeut la survie des cellules leucémiques HCL mais pas leur prolifération. Cette observation est cohérente au vu du rôle de *CD38* dans les lymphocytes B matures. L'absence de modulation des propriétés prolifératives selon la présence ou non de *CD38* pourrait s'expliquer par l'induction de voies de signalisation particulières dans le contexte de l'HCL. Nous avons tenté d'éclaircir ce point par l'étude des voies de signalisation liées aux corécepteurs de *CD38* (BCR) et aux voies d'apoptose (caspases, apoptose mitochondriale, récepteurs RIP...). Cependant, la faible différence d'apoptose observée ne nous a pas permis de voir de différences au niveau des expressions des protéines de ces différentes voies (étude par Western Blot, données non montrées). Une induction de ces voies de signalisation par

stimulation de CD38 grâce au CD31 ou un anticorps agoniste serait nécessaire.

La voie calcique semble importante dans le développement de l'HCL, car les flux calciques participent à la survie des cellules HCL [86]. Cependant, dans notre modèle, l'invalidation de CD38 ne modifie pas ces flux calciques. L'impact de CD38 sur la survie cellulaire semblerait donc plus lié à son activité réceptrice qu'à son rôle d'ectoenzyme. Ceci est en rapport avec les données de la littérature présentant cette activité réceptrice comme plutôt liée aux phénomènes de survie et de prolifération, tandis que l'activité NAD-glycohydrolase influe plus généralement sur les phénomènes de migration des cellules [167]. Il serait cependant intéressant de mesurer si une modification de production du principal métabolite inducteur de flux calciques, l'ADPRc est observable lorsque CD38 est absent. Nous avons pour projet de mettre au point un tel test enzymatique au laboratoire, d'après les travaux de Graeff *et al* [256]. Nous aurions pu ainsi déterminer si l'absence de variation des flux calciques dans le modèle JOK-KO / JOK-WT était due à une expression basale insuffisante de CD38 ou à une absence d'activité enzymatique de CD38 dans ce modèle.

Nous avons montré que CD38 favorisait l'adhérence de la lignée cellulaire JOK-1 à l'endothélium. Cependant, ici encore, la variation de ces propriétés d'adhérence est plus faible lors du KO de CD38 que lorsque RhoH est surexprimée dans l'HCL [110]. La répression de CD38 n'explique donc que partiellement la diminution d'adhérence à l'endothélium induite par RhoH. Ainsi, le transcriptome montre la modulation de gènes de molécules d'adhérence. Par exemple, le gène *NRXN3* codant la Neurexine-3, une protéine de surface participant à l'adhérence des cellules neuronales [257], est réprimée d'un facteur 4. De même, l'expression du gène codant l'intégrine $\beta 7$ est diminuée d'un facteur 2,1 dans la lignée JOK-R. L'ensemble de ces gènes constituent autant de cibles de RhoH pouvant participer à ce phénomène de perte d'adhérence cellulaire.

CD38 ne semble pas impacter l'adhérence aux cellules stromales mais ceci peut être expliqué par l'absence d'expression de CD31 par la lignée HS-5, ce dernier étant le principal partenaire d'interaction des cellules stromales avec CD38 [222]. Nos expériences ont montré une plus forte adhérence (d'un facteur 2) des cellules HCL aux cellules stromales qu'aux cellules endothéliales. Cet état de fait est particulièrement intéressant à observer dans l'HCL, où les cellules restent ancrées à la niche médullaire protectrice qui prodigue un environnement favorable à leur persistance et au maintien d'une MRD après traitement. Etudier l'impact des interactions CD38/CD31 entre les cellules HCL et stromales, en renouvelant nos expériences

avec une lignée HS-5 présentant une expression ectopique de CD31 ou en utilisant d'autres cellules stromales exprimant CD31, se révélerait d'une grande utilité dans la compréhension de ces mécanismes de résistance liés au microenvironnement médullaire.

Nos expériences de migration transendothéliale ont montré que CD38 diminuait la propension des cellules JOK-1 à migrer à travers l'endothélium microvasculaire. Cette observation peut sembler contradictoire avec les résultats observés après la surexpression de RhoH qui diminue cette capacité migratoire dans ce modèle [110]. Dans le cancer, les phénomènes d'adhérence et de migration sont liés dans un contexte dynamique et chronologique afin de permettre la migration des cellules nécessaire à la métastase. Les molécules jouant sur l'un et l'autre de ces deux phénomènes sont différentes et l'adhérence provoque des interactions d'intégrines favorisant l'expression d'autres protéines qui sont, elles, impliquées dans la migration. Ainsi, certaines intégrines, les sélectines (P- et E-sélectines) et des membres de la super famille des immunoglobulines participent aux phénomènes d'adhérence tandis que d'autres intégrines (CD49d/e) et les métalloprotéases sont impliquées directement dans les phénomènes de migration [258]–[260]. Or CD38 est connu pour être une molécule d'adhérence, établissant des interactions de type sélectine, mais n'est pas une intégrine facilitant à elle seule la migration. Il est alors logique que l'étude de la migration transendothéliale menée dans un contexte où seul CD38 est modulé conduise, quand il est exprimé, à favoriser la rétention des cellules sur le tapis endothélial. Ceci aboutit finalement à une diminution du nombre de cellules ayant migré. Dans le cas de la surexpression de RhoH, la répression de CD38 participe à la diminution de l'adhérence à l'endothélium, et la répression d'autres intégrines étant réprimées par RhoH (tel le CD11c [63], [110]) atténue la migration transendothéliale.

Notons que Gallay *et al* ont démontré, dans la LAM, qu'un excès de CD38 favorise l'ancrage à la moelle osseuse alors que l'excès de CD31 favorise la migration transendothéliale [202]. CD38 a été décrit comme capable d'augmenter l'expression de métalloprotéases et la réponse aux cytokines et *in fine*, de favoriser la migration des leucocytes, par induction de sa signalisation après interaction avec CD31 [225], [261]. Des interactions *in vitro* sur des temps longs (5 jours) entre des cellules de LLC CD38⁺ et des fibroblastes murins CD31⁺ activent une signature génétique favorisant la migration [223]. Dans nos expériences dans l'HCL, les temps d'incubation (16 h) utilisés sont peut-être trop courts pour permettre l'induction suffisante de l'expression de ces gènes et, *a fortiori*, des protéines nécessaires à la migration transendothéliale. Ceci pourrait expliquer l'effet plutôt

antagoniste de CD38 sur les phénomènes migratoires observés dans nos conditions expérimentales.

CD38 étant capable de se lier au hyaluronate (HA), étudier son rôle dans la propension des cellules HCL à adhérer à la niche médullaire serait également d'un grand intérêt. En effet, la moelle osseuse est particulièrement riche en HA [38]. L'expression de CD38 chez certains patients pourrait ainsi favoriser l'ancrage des cellules leucémiques à cette niche médullaire et donc l'EMDR. Afin d'étudier ce phénomène, des expériences d'adhérence cellulaire *in vitro*, utilisant nos modèles KO CD38 et des matrices contenant du HA (ex : Glycosyl[®], développé par la société ESI Bio[®]), pourraient être envisagées.

CD38 est un acteur important dans le développement d'une autre hémopathie maligne B ayant des caractéristiques communes avec l'HCL : la LLC. En effet, ces deux leucémies montrent une prolifération de lymphocytes B à un stade de différenciation avancé. Elles peuvent toutes les deux avoir une évolution passant d'indolente à agressive. Elles possèdent toutes les deux des profils d'expression génique les apparentant aux lymphocytes B mémoires [8], [9]. Elles partagent également des similitudes vis-à-vis de CD38. Environ 1/3 des patients de ces deux pathologies expriment CD38 (la limite de positivité étant fixée à 30% de cellules CD38⁺) [218], [227], [248]. Cette protéine participe à la survie et à l'adhérence à l'endothélium des cellules de ces deux leucémies [219], [220], [223], [245].

Cependant, les effets de CD38 dans la LLC sur les interactions des cellules tumorales leucémiques avec le microenvironnement tumoral peuvent-ils être raisonnablement extrapolés à l'HCL ? L'étude de ce rôle de CD38 sur le microenvironnement des cellules HCL mérite-t-il d'être investigué ? Tout porte à croire que ce serait le cas. Ce sujet serait d'un intérêt majeur dans la compréhension des mécanismes de persistance des cellules HCL, tant la question du rôle du microenvironnement montrent des similitudes avec la LLC, pour laquelle la communauté scientifique partage actuellement un engouement.

En effet, CD38 agit de manière synergique avec d'autres molécules réceptrices participant à la migration et au « nichage » des cellules dans des sites permissifs préférentiels. Ainsi, CD38 favorise la migration des cellules de LLC induite par le CXCL12 en augmentant la phosphorylation de Erk1/2 lorsque le CXCR4 est stimulé par le CXCL12 [225]. Ce phénomène pourrait être important dans les mécanismes d'EMDR dans l'HCL, où les interactions CXCL12-CXCR4 sont prépondérantes (cf. **Figure 4**). L'axe CD38/PC-1/CD73/ADO présente également un intérêt particulier dans le contexte de l'HCL, où l'ADO

pourrait induire une immunosuppression permettant aux cellules responsables d'une maladie résiduelle de subsister (cf. **Figure 15**) [210]. L'ADO est également capable d'induire la fibrose de la moelle osseuse, caractéristique importante de l'HCL et favorisant la rétention des cellules à la niche médullaire [209]. CD38 semble donc un acteur important dans les interactions des cellules leucémiques avec leur microenvironnement. De plus, les cellules de LLC circulantes présentent une résistance à l'apoptose à laquelle CD38 participe, mais ne prolifèrent pas en réponse à sa stimulation, alors que les cellules présentes dans les niches ganglionnaires prolifèrent mais ne résistent pas à l'apoptose lorsque CD38 est activé [248].

Ces dernières observations pourraient permettre d'ailleurs d'expliquer nos résultats de protection vis à vis de l'apoptose et d'absence d'induction de la prolifération, car CD38 est ici étudié sur des cultures cellulaires en suspension. L'utilisation de notre modèle KO dans des systèmes de culture 3D mimant le microenvironnement pourrait fournir un début d'explication. De même, l'impact réel de CD38 sur l'ancrage des cellules HCL à la niche médullaire pourrait être étudié *in vivo* par injection intraveineuse des cellules JOK-WT et JOK-KO chez la souris NSG. Le rôle de CD38 dans la rétention des cellules HCL au sein de la moelle osseuse ou leur migration vers la circulation sanguine pourrait être également étudié après injection intratibiale de notre modèle cellulaire d'HCL dans le même système murin.

Nous avons ainsi démontré que CD38 a un rôle actif dans la progression de l'HCL, et que son ciblage direct ou celui des composants de sa signalisation cellulaire pourrait présenter un intérêt thérapeutique dans le traitement de patients CD38⁺ développant un HCL réfractaire.

3. CD38 : un marqueur de mauvais pronostic et une cible thérapeutique dans l'HCL

Malgré une évolution lente de la maladie et des outils thérapeutiques efficaces dans la majorité des cas [29]–[33], une part notable des patients HCL récidivera à long terme à cause du maintien d'une MRD. Un des vrais défis actuels est de pouvoir gérer cette MRD, soit en l'éradiquant, soit en maintenant les cellules HCL résiduelles dans un état latent et en prolongeant la RC. La manière de traiter cette MRD est complexe. En effet, tenter d'éliminer les dernières cellules HCL demanderait de maintenir une chimiothérapie prolongée. Outre les problèmes de coût de ces traitements prolongés, le maintien des traitements pourrait s'avérer délétère pour le patient en favorisant la survenue d'effets secondaires hématologiques et en maintenant les derniers clones HCL sous une pression de sélection, risquant de faire émerger

une forme réfractaire de la maladie par accumulation d'aberrations moléculaires. Le traitement des formes réfractaires de la maladie constitue également un enjeu majeur.

La solution semble résider dans l'utilisation de nouvelles thérapies. L'avènement des thérapies ciblées, tels les inhibiteurs de b-Raf V600E et de la voie du BCR, semble prometteur [72], [84]. Cependant, des formes résistantes à ces nouveaux traitements ont déjà été découvertes [57]. Ceci nécessite de maintenir l'effort de recherche vers de nouvelles thérapies.

Les travaux précédents menés par notre laboratoire ayant montré l'intérêt thérapeutique de mimer les effets moléculaires de RhoH dans l'HCL ont ouvert le chemin à des nouvelles options de traitements. De plus, RhoH est capable de contrecarrer l'action de Rac1 et Cdc42 qui promeuvent la prolifération des cellules HCL [104], [105]. Cependant, mimer l'action de RhoH, par des petites molécules de synthèse ou des protéines recombinantes, s'avèrerait très complexe. En effet, les domaines d'interaction de RhoH avec ses partenaires restent à déterminer et la structure cristallographique de RhoH est encore inconnue. Le *design* de petites molécules ou de peptides est alors compromis. De plus, la vectorisation de telles molécules, afin de les administrer sélectivement aux cellules cibles, serait délicate. Enfin, RhoH étant une protéine intracellulaire, la molécule thérapeutique devrait passer la membrane plasmique avant d'atteindre sa cible, compliquant d'autant plus la vectorisation. Une protéine thérapeutique devrait en plus être correctement conformée pour aboutir à l'action désirée. La découverte du lien fonctionnel entre RhoH et CD38 fournit donc une cible alternative, exprimée à la surface des cellules leucémiques et donc plus facile à cibler.

Le ciblage thérapeutique de CD38 a déjà montré son efficacité dans le myélome multiple et est en cours d'évaluation clinique dans la LLC [204]. Mais qu'en est-il dans l'HCL ? Les données produites par nos collaborateurs à Caen ont confirmé qu'un tiers des patients HCL expriment CD38 (sur une cohorte de 43 patients français), en accord avec les données de Juliusson *et al.* L'analyse des données de survie a montré que les patients CD38⁺ récidivaient plus vite que les patients CD38⁻ (41 mois plus tôt en moyenne). Pour les 23 patients ayant déjà récidivé, la différence est encore plus grande (les patients CD38⁺ ont récidivé 71 mois en moyenne avant les patients CD38⁻) (cf. **Figure 59**) [248].

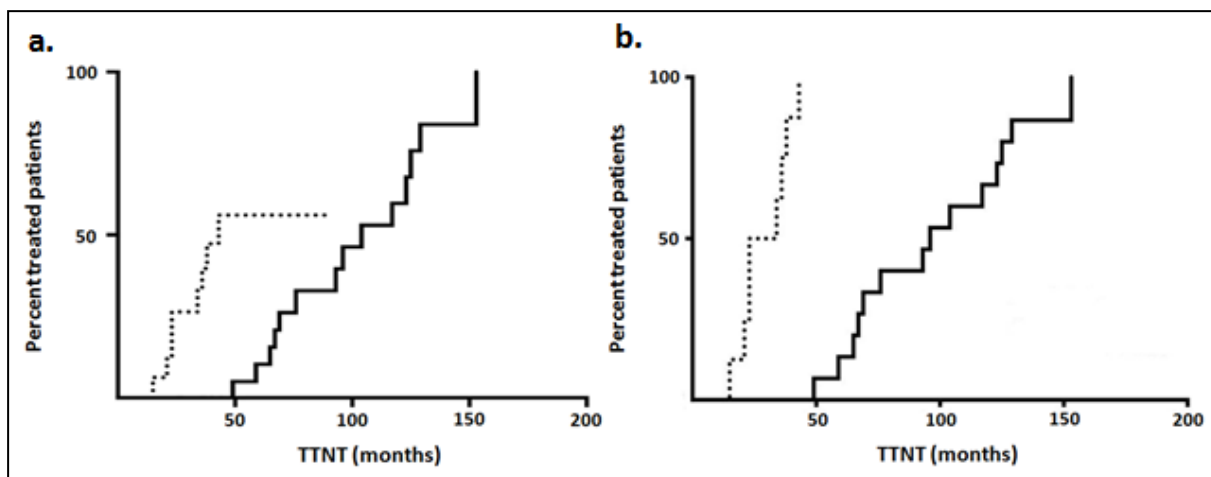


Figure 59 : a) Graphique Kaplan Meier montrant le temps entre la fin de la thérapie de première ligne et le début de la thérapie de seconde ligne pour les 43 patients de l'étude. b) Graphique Kaplan Meier montrant le temps entre la fin de la thérapie de première ligne et le début de la thérapie de seconde ligne pour les 23 patients ayant rechuté de leur leucémie. Les lignes en pointillés représentent les patients CD38⁺ et celles en trait plein représentent les patients CD38⁻. TTNT : Time to next treatment. Données produites par le Pr Xavier Troussard et le Dr Edouard Cornet. Tiré de Poret *et al* [248].

De plus, l'évaluation de l'efficacité de l'anticorps thérapeutique SAR650984 ciblant CD38 a été effectuée par nos collaborateurs aux USA, sur la lignée JOK-1 exprimant de manière stable un vecteur d'expression de la luciférase. Ce système de traceur a permis d'observer le développement des tumeurs induites par xénogreffe chez la souris Nude avant et après traitement par le SAR650984 ou par un anticorps contrôle, par une technique d'« *in vivo imaging* ». On observe le développement de tumeurs 3 jours après injection. Le jour 4, le SAR650984 ou l'anticorps contrôle sont injectés aux souris. Au jour 7, on observe une stagnation ou une régression des tumeurs chez les souris traitées par le SAR650984 et une croissance des tumeurs chez les souris traitées par l'anticorps contrôle (cf. **Figure 60**).

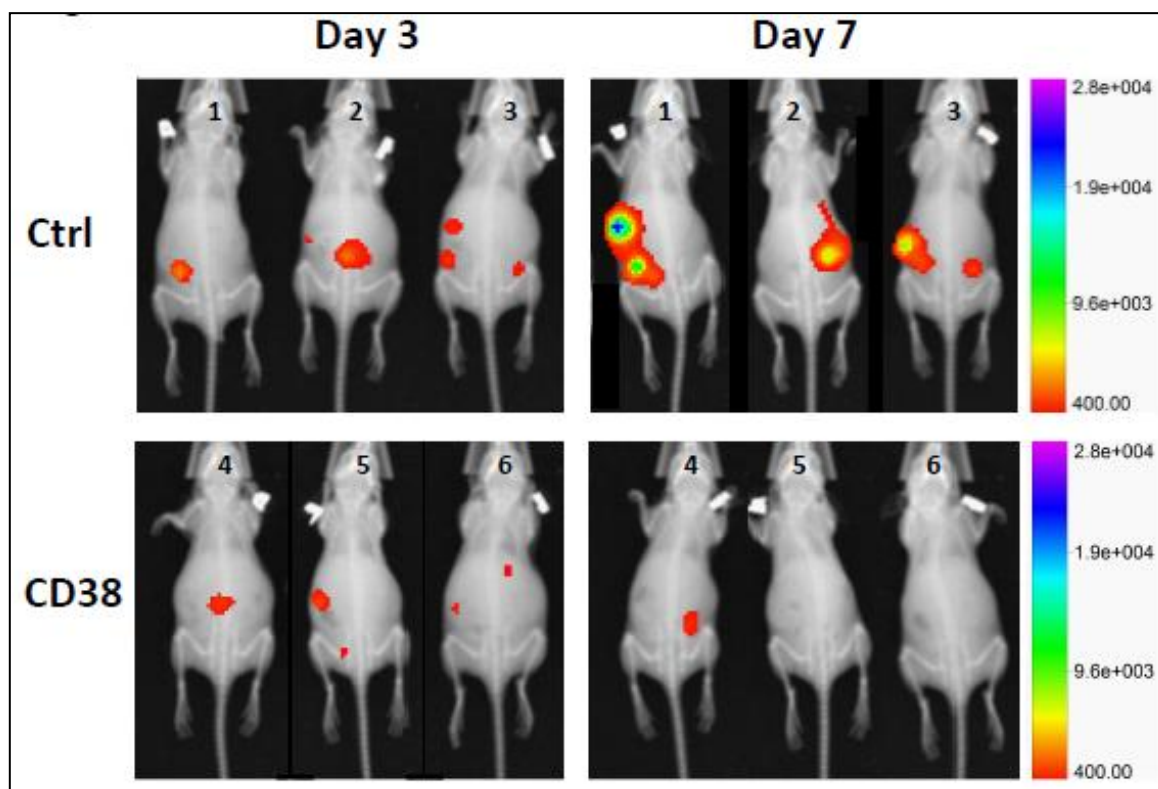


Figure 60 : Observation par *in vivo imaging* du développement des tumeurs HCL après traitement par un anticorps anti-CD38. CD38 : souris traitées par l'anticorps SAR650984 / Ctrl : souris traitées par l'anticorps contrôle. Données produites par le Dr Qiangwei Fu et le Dr Carl Simon Shelley. Tiré de Poret *et al* [248].

Nous avons ainsi prouvé que CD38 est un marqueur de mauvais pronostic pour la récurrence de l'HCL et son ciblage par des anticorps monoclonaux thérapeutiques devrait être efficace dans le traitement de l'HCL. De plus, en ciblant cette protéine, la probabilité d'éradiquer une population de cellules à haut risque de récurrence est augmentée.

CD38 a pour le moment été ciblé par des anticorps monoclonaux induisant une réponse cellulaire par le système immunitaire ou une de ses voies de signalisation conduisant à l'apoptose. La stratégie des anticorps couplés à une immunotoxine devrait également être explorée. En effet, dans le cas des anticorps monoclonaux ciblant le CD22 ou le CD25, l'ajout d'une immunotoxine fixée de manière covalente sur l'anticorps a montré une très bonne efficacité dans le traitement de l'HCL réfractaire aux analogues de purines [2]. Il faudra cependant garder à l'esprit le caractère ubiquitaire de l'expression de CD38 dans l'organisme, qui augmente le risque de développement d'effets secondaires par action de ces anticorps sur d'autres cellules, pulmonaires, nerveuses ou pancréatiques notamment. L'étude clinique la plus avancée, portant sur le daratumumab, a montré l'apparition d'effets secondaires

hématologiques graves chez un patient, ainsi que des bronchospasmes chez deux autres, parmi 32 patients [203].

L'utilisation des anticorps monoclonaux ciblant CD38 ayant montré une efficacité modeste en monothérapie dans le myélome multiple, l'association en combinaison avec d'autres traitements pourraient se révéler bénéfique dans le traitement de l'HCL réfractaire. L'association daratumumab + lenalidomide + dexaméthasone a montré une très forte efficacité dans le MM réfractaire [203]. Une combinaison des anti-CD38 avec les analogues de purines ou le vémurafenib mérite d'être considérée. Celle-ci pourrait permettre de diminuer les doses de chaque molécule et donc de diminuer les risques d'effets secondaires. De plus, du fait de l'importance de CD38 dans les interactions des cellules leucémiques avec le microenvironnement, son ciblage pourrait diminuer l'ancrage des cellules à la moelle osseuse, et ainsi augmenter leur chimiosensibilité au traitement par analogues de purines en augmentant le passage des cellules dans la circulation sanguine [202].

A tous ces titres, l'HCL devrait être ajoutée à la liste des hémopathies malignes CD38⁺ pour lesquels les anticorps thérapeutiques anti-CD38 sont en cours d'essais cliniques. De plus, la corrélation entre l'expression de CD38 et un risque de rechute plus rapide devrait être pris en compte dans le suivi des patients après traitement.

L'usage de CD38 comme une balise permettant de cibler les cellules leucémiques s'avère efficace, mais d'autres stratégies peuvent être envisagées. Ainsi, nos données d'éradication des tumeurs produites par xénogreffe des cellules JOK-1 chez la souris immunodéficiente laissent penser à un effet pro-apoptotique du SAR650984 indépendant des mécanismes CDC et ADCC propres aux anticorps. Les données d'autres auteurs suggèrent la même idée. Il est donc possible d'induire ou de mimer une induction d'apoptose par la voie de signalisation de CD38. Il reste encore à déterminer quelles sont ces voies particulières liées à l'apoptose et induites par CD38 dans le contexte de l'HCL. Ces découvertes pourraient ouvrir la voie à l'utilisation de nouvelles molécules capables de mimer cette action de CD38. Une autre stratégie pourrait consister à inhiber l'activité enzymatique de CD38, qui semble liée à la progression tumorale dans la LLC [226]. Nos données préliminaires indiquent cependant que l'action ectoenzymatique de CD38 ne participe pas à la progression de l'HCL.

CONCLUSION GENERALE

A une époque où la génération issue du baby-boom tend à entrer dans le 3^{ème} âge, l'incidence de la tricholeucocytose est susceptible d'augmenter dans un futur proche. Malgré des thérapies de première ligne efficaces et le développement de nouvelles thérapies ciblées, des récurrences et formes réfractaires de l'HCL nécessitent le développement de nouvelles thérapies visant à éviter ces récurrences et à traiter efficacement les formes réfractaires.

La protéine RhoH a été décrite comme un facteur pouvant contrecarrer la progression tumorale dans cette hémopathie maligne. Malheureusement, mimer son action à des fins thérapeutiques est quasiment impossible. Cependant, la protéine CD38 est un marqueur de surface dont l'expression dans l'HCL dépend de RhoH. Le mécanisme de régulation du gène *CD38* par cette petite protéine G reste mal compris, mais semblerait faire intervenir de manière directe ou indirecte le facteur de transcription Smad1. Il serait désormais nécessaire de confirmer l'implication de ce dernier dans ce mécanisme de régulation, par étude de ChIP et transfection stable d'un vecteur d'expression de cette protéine dans notre modèle d'HCL.

CD38 constitue un marqueur de mauvais pronostic dans l'HCL, ainsi qu'une cible thérapeutique intéressante. De plus, il n'est pas seulement un indicateur passif d'un développement plus agressif de la maladie : il est acteur dans la progression tumorale, protège les cellules HCL de l'apoptose et favorise leur adhérence à l'endothélium. CD38 ne semble cependant que participer partiellement à l'effet anti-tumoral de RhoH, et d'autres gènes dont l'expression est modulée par RhoH devraient être étudiés afin de mieux comprendre l'action de cette protéine. Ainsi, les gènes *GAS7*, *SMAD1*, *MEIS1* et *CSF1R* pourraient être impliqués dans la prolifération des cellules leucémiques ; les gènes *HRK* et *BMF* dans les phénomènes de survie et les gènes *NRXN3* et *ITGB7* dans l'adhérence cellulaire.

Le rôle de CD38 dans le développement de l'HCL présente des similitudes avec son rôle dans la LLC. Dans un contexte où le microenvironnement est particulièrement important dans les phénomènes de récurrence et de résistance au traitement dans ces deux leucémies, l'élucidation de l'impact de CD38 sur ce microenvironnement tumoral aiderait à une meilleure compréhension de ce mécanisme essentiel. A cette fin, il serait intéressant d'étudier l'impact de CD38 sur les phénomènes d'ancrage à la niche médullaire et sur la répartition

sang/moelle *in vivo* des lignées cellulaires HCL sauvages et KO-CD38, dans le modèle murin NSG.

Bien que le ciblage de CD38 par des anticorps monoclonaux soit le plus évident, envisager des stratégies alternatives, par l'inhibition de sa voie de signalisation ou de son activité enzymatique, pourraient permettre d'élargir l'arsenal thérapeutique dans le traitement de l'HCL réfractaire, pour le tiers de patients exprimant ce marqueur de surface.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] B. A. Bouroncle, B. K. Wiseman, and C. A. Doan, "Leukemic reticuloendotheliosis," *Blood*, vol. **13**, no. 7, pp. 609–630, Jul. 1958.
- [2] R. J. Kreitman, "Hairy cell leukemia-new genes, new targets," *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, vol. **8**, no. 3, pp. 184–195, Sep. 2013.
- [3] M. R. Grever, "How I treat hairy cell leukemia," *Blood*, vol. **115**, no. 1, pp. 21–28, Jan. 2010.
- [4] K. Foucar, Falini B, Catovsky D, and Stein H., "Hairy Cell Leukaemia. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press.," pp. 188–190.
- [5] S. O. Wanko and C. de Castro, "Hairy cell leukemia: an elusive but treatable disease," *The oncologist*, vol. **11**, no. 7, pp. 780–789, Aug. 2006.
- [6] K. Maloum, C. Magnac, Z. Azgui, C. Cau, F. Charlotte, J. L. Binet, H. Merle-Béral, and G. Dighiero, "VH gene expression in hairy cell leukaemia," *Br. J. Haematol.*, vol. **101**, no. 1, pp. 171–178, Apr. 1998.
- [7] E. Arons, L. Roth, J. Sapolsky, T. Suntum, M. Stetler-Stevenson, and R. J. Kreitman, "Evidence of canonical somatic hypermutation in hairy cell leukemia," *Blood*, vol. **117**, no. 18, pp. 4844–4851, May 2011.
- [8] K. Basso, A. Liso, E. Tiacci, R. Benedetti, A. Pulsoni, R. Foa, F. Di Raimondo, A. Ambrosetti, A. Califano, U. Klein, R. Dalla Favera, and B. Falini, "Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors," *J. Exp. Med.*, vol. **199**, no. 1, pp. 59–68, Jan. 2004.
- [9] U. Klein, Y. Tu, G. A. Stolovitzky, M. Mattioli, G. Cattoretti, H. Husson, A. Freedman, G. Inghirami, L. Cro, L. Baldini, A. Neri, A. Califano, and R. Dalla-Favera, "Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells," *J. Exp. Med.*, vol. **194**, no. 11, pp. 1625–1638, Dec. 2001.
- [10] S. D. Wagner, V. Martinelli, and L. Luzzatto, "Similar patterns of V kappa gene usage but different degrees of somatic mutation in hairy cell leukemia, prolymphocytic leukemia, Waldenstrom's macroglobulinemia, and myeloma," *Blood*, vol. **83**, no. 12, pp. 3647–3653, Jun. 1994.
- [11] L. A. Rozenszajn, A. Gutman, J. Radnay, E. B. David, and D. Shoham, "A study of the nature of 'hairy' cells, with emphasis on enzymatic markers," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. **66**, no. 2, pp. 432–441, Aug. 1976.
- [12] S. S. Chung, E. Kim, J. H. Park, Y. R. Chung, P. Lito, J. Teruya-Feldstein, W. Hu, W. Beguelin, S. Monette, C. Duy, R. Rampal, L. Telis, M. Patel, M. K. Kim, K. Huberman, N. Bouvier, M. F. Berger, A. M. Melnick, N. Rosen, M. S. Tallman, C. Y. Park, and O. Abdel-Wahab, "Hematopoietic stem cell origin of BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia," *Sci. Transl. Med.*, vol. **6**, no. 238, p. 238ra71, May 2014.
- [13] E. Cornet, A. Delmer, P. Feugier, F. Garnache-Ottou, D. Ghez, V. Leblond, V. Levy, F. Maloisel, D. Re, J.-M. Zini, X. Troussard, and French Society of Haematology, "Recommendations of the SFH (French Society of Haematology) for the diagnosis, treatment and follow-up of hairy cell leukaemia," *Ann. Hematol.*, vol. **93**, no. 12, pp. 1977–1983, Dec. 2014.
- [14] E. Matutes, R. Morilla, K. Owusu-Ankomah, A. Houliham, P. Meeus, and D. Catovsky, "The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to

- distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes," *Leuk. Lymphoma*, vol. **14** Suppl 1, pp. 57–61, 1994.
- [15] E. Tiacci, V. Trifonov, G. Schiavoni, A. Holmes, W. Kern, M. P. Martelli, A. Pucciarini, B. Bigerna, R. Pacini, V. A. Wells, P. Sportoletti, V. Pettirossi, R. Mannucci, O. Elliott, A. Liso, A. Ambrosetti, A. Pulsoni, F. Forconi, L. Trentin, G. Semenzato, G. Inghirami, M. Capponi, F. Di Raimondo, C. Patti, L. Arcaini, P. Musto, S. Pileri, C. Haferlach, S. Schnittger, G. Pizzolo, R. Foà, L. Farinelli, T. Haferlach, L. Pasqualucci, R. Rabadan, and B. Falini, "BRAF mutations in hairy-cell leukemia," *N. Engl. J. Med.*, vol. **364**, no. 24, pp. 2305–2315, Jun. 2011.
 - [16] E. M. Boyd, A. J. Bench, M. B. van 't Veer, P. Wright, D. M. Bloxham, G. A. Follows, and M. A. Scott, "High resolution melting analysis for detection of BRAF exon 15 mutations in hairy cell leukaemia and other lymphoid malignancies," *Br. J. Haematol.*, vol. **155**, no. 5, pp. 609–612, Dec. 2011.
 - [17] E. Tiacci, G. Schiavoni, F. Forconi, A. Santi, L. Trentin, A. Ambrosetti, D. Cecchini, E. Sozzi, P. Francia di Celle, C. Di Bello, A. Pulsoni, R. Foà, G. Inghirami, and B. Falini, "Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation," *Blood*, vol. **119**, no. 1, pp. 192–195, Jan. 2012.
 - [18] L. Xi, E. Arons, W. Navarro, K. R. Calvo, M. Stetler-Stevenson, M. Raffeld, and R. J. Kreitman, "Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation," *Blood*, vol. **119**, no. 14, pp. 3330–3332, Apr. 2012.
 - [19] S. Schnittger, U. Bacher, T. Haferlach, N. Wendland, M. Ulke, F. Dicker, V. Grossmann, C. Haferlach, and W. Kern, "Development and validation of a real-time quantification assay to detect and monitor BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia," *Blood*, vol. **119**, no. 13, pp. 3151–3154, Mar. 2012.
 - [20] S. Tschernitz, L. Flossbach, M. Bonengel, S. Roth, A. Rosenwald, and E. Geissinger, "Alternative BRAF mutations in BRAF V600E-negative hairy cell leukaemias," *Br. J. Haematol.*, vol. **165**, no. 4, pp. 529–533, May 2014.
 - [21] S. E. Langabeer, D. O'Brien, S. Liptrot, C. M. Flynn, P. J. Hayden, E. Conneally, P. V. Browne, and E. Vandenberghe, "Correlation of the BRAF V600E mutation in hairy cell leukaemia with morphology, cytochemistry and immunophenotype," *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. **34**, no. 4, pp. 417–421, Aug. 2012.
 - [22] S. E. Langabeer, D. O'Brien, A. M. McElligott, M. Lavin, and P. V. Browne, "BRAF V600E-Negative Hairy Cell Leukaemia," *Case Rep. Hematol.*, vol. **2013**, p. 513049, 2013.
 - [23] E. Matutes, A. Wotherspoon, and D. Catovsky, "The variant form of hairy-cell leukaemia," *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. **16**, no. 1, pp. 41–56, Mar. 2003.
 - [24] T. Robak, "Hairy-cell leukemia variant: recent view on diagnosis, biology and treatment," *Cancer Treat. Rev.*, vol. **37**, no. 1, pp. 3–10, Feb. 2011.
 - [25] T. Machii, Y. Tokumine, R. Inoue, and T. Kitani, "Predominance of a distinct subtype of hairy cell leukemia in Japan," *Leukemia*, vol. **7**, no. 2, pp. 181–186, Feb. 1993.
 - [26] J. R. Quesada, J. Reuben, J. T. Manning, E. M. Hersh, and J. U. Gutterman, "Alpha interferon for induction of remission in hairy-cell leukemia," *N. Engl. J. Med.*, vol. **310**, no. 1, pp. 15–18, Jan. 1984.
 - [27] C. Huber, W. Aulitzky, H. Tilg, I. von Lüttichau, J. Troppmair, K. Nachbauer, and G. Gastl, "Studies on the optimal dose and the mode of action of alpha-interferon in the treatment of hairy cell leukemia," *Leukemia*, vol. **1**, no. 4, pp. 355–357, Apr. 1987.

- [28] M. S. Tallman, "Understanding the action of interferon in hairy cell leukemia: the past as prologue," *Leuk. Res.*, vol. **26**, no. 4, pp. 407–408, Apr. 2002.
- [29] E. H. Kraut, B. A. Bouroncle, and M. R. Grever, "Low-dose deoxycoformycin in the treatment of hairy cell leukemia," *Blood*, vol. 68, no. 5, pp. 1119–1122, Nov. 1986.
- [30] E. H. Kraut, M. R. Grever, and B. A. Bouroncle, "Long-term follow-up of patients with hairy cell leukemia after treatment with 2'-deoxycoformycin," *Blood*, vol. **84**, no. 12, pp. 4061–4063, Dec. 1994.
- [31] F. Maloisel, L. Benboubker, M. Gardembas, B. Coiffier, M. Divine, C. Sebban, M. Blanc, J.-F. Abgrall, P. Lederlin, J.-L. Harousseau, A.-M. Blaise, B. Grosbois, P. Morice, C. Ghandour, and S. Castaigne, "Long-term outcome with pentostatin treatment in hairy cell leukemia patients. A French retrospective study of 238 patients," *Leukemia*, vol. **17**, no. 1, pp. 45–51, Jan. 2003.
- [32] L. D. Piro, C. J. Carrera, D. A. Carson, and E. Beutler, "Lasting remissions in hairy-cell leukemia induced by a single infusion of 2-chlorodeoxyadenosine," *N. Engl. J. Med.*, vol. **322**, no. 16, pp. 1117–1121, Apr. 1990.
- [33] A. Saven, C. Burian, J. A. Koziol, and L. D. Piro, "Long-term follow-up of patients with hairy cell leukemia after cladribine treatment," *Blood*, vol. **92**, no. 6, pp. 1918–1926, Sep. 1998.
- [34] M. Else, C. E. Dearden, E. Matutes, J. Garcia-Talavera, A. Z. S. Rohatiner, S. A. N. Johnson, N. T. J. O'Connor, A. Haynes, N. Osuji, F. Forconi, F. Lauria, and D. Catovsky, "Long-term follow-up of 233 patients with hairy cell leukaemia, treated initially with pentostatin or cladribine, at a median of 16 years from diagnosis," *Br. J. Haematol.*, vol. **145**, no. 6, pp. 733–740, Jun. 2009.
- [35] E. Arons, T. Suntum, M. Stetler-Stevenson, and R. J. Kreitman, "VH4-34+ hairy cell leukemia, a new variant with poor prognosis despite standard therapy," *Blood*, vol. **114**, no. 21, pp. 4687–4695, Nov. 2009.
- [36] J. H. Park and M. S. Tallman, "Left behind: should minimal residual disease be treated in hairy cell leukemia?," *Leuk. Lymphoma*, vol. **55**, no. 5, pp. 971–972, May 2014.
- [37] K. H. Shain, W. S. Dalton, and J. Tao, "The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature B-cell malignancies," *Oncogene*, Feb. 2015.
- [38] J. C. Cawley, "Hairy cell leukemia and the microenvironment," *Leuk. Lymphoma*, vol. **52** Suppl 2, pp. 91–93, Jun. 2011.
- [39] K. A. Aziz, K. J. Till, M. Zuzel, and J. C. Cawley, "Involvement of CD44-hyaluronan interaction in malignant cell homing and fibronectin synthesis in hairy cell leukemia," *Blood*, vol. **96**, no. 9, pp. 3161–3167, Nov. 2000.
- [40] J. C. Kluin-Nelemans, M. G. Kester, J. J. Melenhorst, J. E. Landegent, L. van de Corput, R. Willemze, and J. H. Falkenburg, "Persistent clonal excess and skewed T-cell repertoire in T cells from patients with hairy cell leukemia," *Blood*, vol. **87**, no. 9, pp. 3795–3802, May 1996.
- [41] S. Wong and D. Fulcher, "Chemokine receptor expression in B-cell lymphoproliferative disorders," *Leuk. Lymphoma*, vol. **45**, no. 12, pp. 2491–2496, Dec. 2004.
- [42] J. A. Burger, M. Sivina, and F. Ravandi, "The microenvironment in hairy cell leukemia: pathways and potential therapeutic targets," *Leuk. Lymphoma*, vol. **52** Suppl 2, pp. 94–98, Jun. 2011.
- [43] F. Morabito, A. G. Recchia, E. Vigna, L. De Stefano, S. Bossio, L. Morabito, M. Pellicanò, A. Palumbo, F. Storino, N. Caruso, and M. Gentile, "Promising therapies for the

- treatment of chronic lymphocytic leukemia," *Expert Opin. Investig. Drugs*, pp. 1–13, Mar. 2015.
- [44] F. Ravandi, J. L. Jorgensen, S. M. O'Brien, S. Verstovsek, C. A. Koller, S. Faderl, F. J. Giles, A. Ferrajoli, W. G. Wierda, S. Odinga, X. Huang, D. A. Thomas, E. J. Freireich, D. Jones, M. J. Keating, and H. M. Kantarjian, "Eradication of minimal residual disease in hairy cell leukemia," *Blood*, vol. **107**, no. 12, pp. 4658–4662, Jun. 2006.
 - [45] J. Nieva, K. Bethel, and A. Saven, "Phase 2 study of rituximab in the treatment of cladribine-failed patients with hairy cell leukemia," *Blood*, vol. **102**, no. 3, pp. 810–813, Aug. 2003.
 - [46] D. A. Thomas, S. O'Brien, C. Bueso-Ramos, S. Faderl, M. J. Keating, F. J. Giles, J. Cortes, and H. M. Kantarjian, "Rituximab in relapsed or refractory hairy cell leukemia," *Blood*, vol. **102**, no. 12, pp. 3906–3911, Dec. 2003.
 - [47] M. Leclerc, F. Suarez, M.-P. Noël, A. Vekhoff, X. Troussard, J.-F. Claisse, C. Thieblemont, F. Maloisel, Y. Beguin, J. Tamburini, C. Barbe, and A. Delmer, "Rituximab therapy for hairy cell leukemia: a retrospective study of 41 cases," *Ann. Hematol.*, vol. **94**, no. 1, pp. 89–95, Jan. 2015.
 - [48] G. Cervetti, S. Galimberti, F. Andreazzoli, R. Fazzi, N. Cecconi, F. Caracciolo, and M. Petrini, "Rituximab as treatment for minimal residual disease in hairy cell leukaemia," *Eur. J. Haematol.*, vol. **73**, no. 6, pp. 412–417, Dec. 2004.
 - [49] R. J. Kreitman, W. H. Wilson, J. D. White, M. Stetler-Stevenson, E. S. Jaffe, S. Giardina, T. A. Waldmann, and I. Pastan, "Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies," *J. Clin. Oncol.*, vol. **18**, no. 8, pp. 1622–1636, Apr. 2000.
 - [50] R. J. Kreitman, M. Stetler-Stevenson, I. Margulies, P. Noel, D. J. P. Fitzgerald, W. H. Wilson, and I. Pastan, "Phase II trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with hairy cell leukemia," *J. Clin. Oncol.*, vol. **27**, no. 18, pp. 2983–2990, Jun. 2009.
 - [51] P. B. Chapman, A. Hauschild, C. Robert, J. B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, R. Dummer, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, D. Hogg, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, A. Ribas, S. J. O'Day, J. A. Sosman, J. M. Kirkwood, A. M. M. Eggermont, B. Dreno, K. Nolop, J. Li, B. Nelson, J. Hou, R. J. Lee, K. T. Flaherty, G. A. McArthur, and BRIM-3 Study Group, "Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation," *N. Engl. J. Med.*, vol. **364**, no. 26, pp. 2507–2516, Jun. 2011.
 - [52] S. Dietrich, H. Glimm, M. Andrulis, C. von Kalle, A. D. Ho, and T. Zenz, "BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia," *N. Engl. J. Med.*, vol. **366**, no. 21, pp. 2038–2040, May 2012.
 - [53] G. A. Follows, H. Sims, D. M. Bloxham, T. Zenz, M. A. Hopper, H. Liu, A. Bench, P. Wright, M. B. Van't Veer, and M. A. Scott, "Rapid response of biallelic BRAF V600E mutated hairy cell leukaemia to low dose vemurafenib," *Br. J. Haematol.*, vol. **161**, no. 1, pp. 150–153, Apr. 2013.
 - [54] F. Peyrade, D. Re, C. Ginet, L. Gastaud, M. Allegra, R. Ballotti, A. Thyss, T. Zenz, P. Auberger, and G. Robert, "Low-dose vemurafenib induces complete remission in a case of hairy-cell leukemia with a V600E mutation," *Haematologica*, vol. **98**, no. 2, pp. 20–22, Feb. 2013.
 - [55] H. Maurer, P. Haas, T. Wengenmayer, M. Lübbert, J. Duyster, and R. Zeiser, "Successful vemurafenib salvage treatment in a patient with primary refractory hairy

- cell leukemia and pulmonary aspergillosis," *Ann. Hematol.*, vol. **93**, no. 8, pp. 1439–1440, Aug. 2014.
- [56] V. Vergote, D. Dierickx, A. Janssens, G. Verhoef, T. Tousseyn, P. Vandenberghe, P. Wolter, and M. Delforge, "Rapid and complete hematological response of refractory hairy cell leukemia to the BRAF inhibitor dabrafenib," *Ann. Hematol.*, vol. **93**, no. 12, pp. 2087–2089, Dec. 2014.
- [57] E. Sári, Z. G. Nagy, K. Baghy, H. Rajnai, C. Bödör, J. Csomor, G. Barna, G. Rudas, I. Kovalszky, and J. Demeter, "Treatment of refractory hairy cell leukemia with a BRAF-inhibitor: lessons to be learnt," *Pathol. Oncol. Res. POR*, vol. **20**, no. 4, pp. 973–980, Oct. 2014.
- [58] F. Forconi, G. Poretti, I. Kwee, E. Sozzi, D. Rossi, P. M. V. Rancoita, D. Capello, A. Rinaldi, E. Zucca, D. Raspadori, V. Spina, F. Lauria, G. Gaidano, and F. Bertoni, "High density genome-wide DNA profiling reveals a remarkably stable profile in hairy cell leukaemia," *Br. J. Haematol.*, vol. **141**, no. 5, pp. 622–630, May 2008.
- [59] A. S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath, and W. Kolch, "MAP kinase signalling pathways in cancer," *Oncogene*, vol. **26**, no. 22, pp. 3279–3290, May 2007.
- [60] J. Downward, "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. **3**, no. 1, pp. 11–22, Jan. 2003.
- [61] R. Roskoski, "RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. **399**, no. 3, pp. 313–317, Aug. 2010.
- [62] A. A. Samatar and P. I. Poulikakos, "Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. **13**, no. 12, pp. 928–942, Dec. 2014.
- [63] F. Nicolaou, J. M. Teodoridis, H. Park, A. Georgakis, O. C. Farokhzad, E. P. Böttlinger, N. Da Silva, P. Rousselot, C. Chomienne, K. Ferenczi, M. A. Arnaout, and C. S. Shelley, "CD11c gene expression in hairy cell leukemia is dependent upon activation of the proto-oncogenes ras and junD," *Blood*, vol. **101**, no. 10, pp. 4033–4041, May 2003.
- [64] P. T. C. Wan, M. J. Garnett, S. M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V. M. Good, C. M. Jones, C. J. Marshall, C. J. Springer, D. Barford, R. Marais, and Cancer Genome Project, "Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF," *Cell*, vol. **116**, no. 6, pp. 855–867, Mar. 2004.
- [65] S. C. Brady, M. L. Coleman, J. Munro, S. M. Feller, N. A. Morrice, and M. F. Olson, "Sprouty2 association with B-Raf is regulated by phosphorylation and kinase conformation," *Cancer Res.*, vol. **69**, no. 17, pp. 6773–6781, Sep. 2009.
- [66] R. Marais, Y. Light, H. F. Paterson, C. S. Mason, and C. J. Marshall, "Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases," *J. Biol. Chem.*, vol. **272**, no. 7, pp. 4378–4383, Feb. 1997.
- [67] C. Papin, A. Denouel-Galy, D. Laugier, G. Calothy, and A. Eychène, "Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf," *J. Biol. Chem.*, vol. **273**, no. 38, pp. 24939–24947, Sep. 1998.
- [68] T. S. Niault and M. Baccarini, "Targets of Raf in tumorigenesis," *Carcinogenesis*, vol. **31**, no. 7, pp. 1165–1174, Jul. 2010.
- [69] C. Wellbrock, S. Rana, H. Paterson, H. Pickersgill, T. Brummelkamp, and R. Marais, "Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF," *PloS One*, vol. **3**, no. 7, p. e2734, 2008.

- [70] B. Zheng, J. H. Jeong, J. M. Asara, Y.-Y. Yuan, S. R. Granter, L. Chin, and L. C. Cantley, "Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation," *Mol. Cell*, vol. **33**, no. 2, pp. 237–247, Jan. 2009.
- [71] S. Liang, A. Sharma, H.-H. Peng, G. Robertson, and C. Dong, "Targeting mutant (V600E) B-Raf in melanoma interrupts immunoediting of leukocyte functions and melanoma extravasation," *Cancer Res.*, vol. **67**, no. 12, pp. 5814–5820, Jun. 2007.
- [72] V. Pettirossi, A. Santi, E. Imperi, G. Russo, A. Pucciarini, B. Bigerna, G. Schiavoni, E. Fortini, A. Spanhol-Rosseto, P. Sportoletti, R. Mannucci, M. P. Martelli, L. Klein-Hitpass, B. Falini, and E. Tiacci, "BRAF inhibitors reverse the unique molecular signature and phenotype of hairy cell leukemia and exert potent antileukemic activity," *Blood*, vol. **125**, no. 8, pp. 1207–1216, Feb. 2015.
- [73] G. Robert, V. Jullian, A. Jacquiel, C. Ginet, M. Dufies, S. Torino, A. Pottier, F. Peyrade, S. Tartare-Deckert, G. Bourdy, E. Deharo, and P. Auberger, "Similikalactone E (SkE), a new weapon in the armamentarium of drugs targeting cancers that exhibit constitutive activation of the ERK pathway," *Oncotarget*, vol. **3**, no. 12, pp. 1688–1699, Dec. 2012.
- [74] E. Tiacci, G. Schiavoni, M. P. Martelli, E. Boveri, R. Pacini, A. Tabarrini, S. Zibellini, A. Santi, V. Pettirossi, E. Fortini, S. Ascani, L. Arcaini, G. Inghirami, M. Paulli, and B. Falini, "Constant activation of the RAF-MEK-ERK pathway as a diagnostic and therapeutic target in hairy cell leukemia," *Haematologica*, vol. **98**, no. 4, pp. 635–639, Apr. 2013.
- [75] A. S. Kamiguti, R. J. Harris, J. R. Slupsky, P. K. Baker, J. C. Cawley, and M. Zuzel, "Regulation of hairy-cell survival through constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathways," *Oncogene*, vol. **22**, no. 15, pp. 2272–2284, Apr. 2003.
- [76] J. J. Waterfall, E. Arons, R. L. Walker, M. Pineda, L. Roth, J. K. Killian, O. D. Abaan, S. R. Davis, R. J. Kreitman, and P. S. Meltzer, "High prevalence of MAP2K1 mutations in variant and IGHV4-34-expressing hairy-cell leukemias," *Nat. Genet.*, vol. **46**, no. 1, pp. 8–10, Jan. 2014.
- [77] S.-Y. Shin, S.-T. Lee, H.-J. Kim, C.-S. Ki, C. W. Jung, J.-W. Kim, and S.-H. Kim, "BRAF V600E and MAP2K1 mutations in hairy cell leukemia and splenic marginal zone lymphoma cases," *Ann. Lab. Med.*, vol. **35**, no. 2, pp. 257–259, Mar. 2015.
- [78] A. G. Gilmartin, M. R. Bleam, A. Groy, K. G. Moss, E. A. Minthorn, S. G. Kulkarni, C. M. Rominger, S. Erskine, K. E. Fisher, J. Yang, F. Zappacosta, R. Annan, D. Sutton, and S. G. Laquerre, "GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition," *Clin. Cancer Res.*, vol. **17**, no. 5, pp. 989–1000, Mar. 2011.
- [79] E. J. Morris, S. Jha, C. R. Restaino, P. Dayananth, H. Zhu, A. Cooper, D. Carr, Y. Deng, W. Jin, S. Black, B. Long, J. Liu, E. Dinunzio, W. Windsor, R. Zhang, S. Zhao, M. H. Angagaw, E. M. Pinheiro, J. Desai, L. Xiao, G. Shipps, A. Hruza, J. Wang, J. Kelly, S. Paliwal, X. Gao, B. S. Babu, L. Zhu, P. Daublain, L. Zhang, B. A. Lutterbach, M. R. Pelletier, U. Philippar, P. Siliphaivanh, D. Witter, P. Kirschmeier, W. R. Bishop, D. Hicklin, D. G. Gilliland, L. Jayaraman, L. Zawel, S. Fawell, and A. A. Samatar, "Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors," *Cancer Discov.*, vol. **3**, no. 7, pp. 742–750, Jul. 2013.
- [80] F. Batteux, O. Garraud, L. Prin, Y. Renaudineau, and R. Vallat, cours d'immunologie, "Lymphocytes B : diversité, ontogénèse, différenciation et activation." ASSIM : Association des collèges des enseignants en immunologie des universités de langue française, 2002.

- [81] N. Chiorazzi, K. R. Rai, and M. Ferrarini, "Chronic lymphocytic leukemia," *N. Engl. J. Med.*, vol. **352**, no. 8, pp. 804–815, Feb. 2005.
- [82] J. G. Monroe, "ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. **6**, no. 4, pp. 283–294, Apr. 2006.
- [83] F. Forconi, "Hairy cell leukaemia: biological and clinical overview from immunogenetic insights," *Hematol. Oncol.*, vol. **29**, no. 2, pp. 55–66, Jun. 2011.
- [84] M. Sivina, R. J. Kreitman, E. Arons, F. Ravandi, and J. A. Burger, "The bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) blocks hairy cell leukaemia survival, proliferation and B cell receptor signalling: a new therapeutic approach," *Br. J. Haematol.*, vol. **166**, no. 2, pp. 177–188, Jul. 2014.
- [85] A. Wiestner, "BCR pathway inhibition as therapy for chronic lymphocytic leukemia and lymphoplasmacytic lymphoma," *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. **2014**, no. 1, pp. 125–134, Dec. 2014.
- [86] E. Génot, G. Bismuth, L. Degos, F. Sigaux, and J. Wietzerbin, "Interferon-alpha downregulates the abnormal intracytoplasmic free calcium concentration of tumor cells in hairy cell leukemia," *Blood*, vol. **80**, no. 8, pp. 2060–2065, Oct. 1992.
- [87] E. Genot, "Interferon alpha and intracytoplasmic free calcium in hairy cell leukemia cells," *Leuk. Lymphoma*, vol. **12**, no. 5–6, pp. 373–381, Feb. 1994.
- [88] J. Hoellenriegel, G. P. Coffey, U. Sinha, A. Pandey, M. Sivina, A. Ferrajoli, F. Ravandi, W. G. Wierda, S. O'Brien, M. J. Keating, and J. A. Burger, "Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration," *Leukemia*, vol. **26**, no. 7, pp. 1576–1583, Jul. 2012.
- [89] A. K. Gopal, B. S. Kahl, S. de Vos, N. D. Wagner-Johnston, S. J. Schuster, W. J. Jurczak, I. W. Flinn, C. R. Flowers, P. Martin, A. Viardot, K. A. Blum, A. H. Goy, A. J. Davies, P. L. Zinzani, M. Dreyling, D. Johnson, L. L. Miller, L. Holes, D. Li, R. D. Dansey, W. R. Godfrey, and G. A. Salles, "PI3K δ inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. **370**, no. 11, pp. 1008–1018, Mar. 2014.
- [90] J. Hoellenriegel, S. A. Meadows, M. Sivina, W. G. Wierda, H. Kantarjian, M. J. Keating, N. Giese, S. O'Brien, A. Yu, L. L. Miller, B. J. Lannutti, and J. A. Burger, "The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia," *Blood*, vol. **118**, no. 13, pp. 3603–3612, Sep. 2011.
- [91] B. J. Lannutti, S. A. Meadows, S. E. M. Herman, A. Kashishian, B. Steiner, A. J. Johnson, J. C. Byrd, J. W. Tyner, M. M. Loriaux, M. Deininger, B. J. Druker, K. D. Puri, R. G. Ulrich, and N. A. Giese, "CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability," *Blood*, vol. **117**, no. 2, pp. 591–594, Jan. 2011.
- [92] J. C. Mulloy, J. A. Cancelas, M.-D. Filippi, T. A. Kalfa, F. Guo, and Y. Zheng, "Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies," *Blood*, vol. **115**, no. 5, pp. 936–947, Feb. 2010.
- [93] K. Wennerberg and C. J. Der, "Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)," *J. Cell Sci.*, vol. **117**, no. Pt 8, pp. 1301–1312, Mar. 2004.
- [94] A. Boureux, E. Vignal, S. Faure, and P. Fort, "Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes," *Mol. Biol. Evol.*, vol. **24**, no. 1, pp. 203–216, Jan. 2007.
- [95] C. F. Welsh, K. Roovers, J. Villanueva, Y. Liu, M. A. Schwartz, and R. K. Assoian, "Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho," *Nat. Cell Biol.*, vol. **3**, no. 11, pp. 950–957, Nov. 2001.

- [96] R. Perona, S. Montaner, L. Saniger, I. Sánchez-Pérez, R. Bravo, and J. C. Lacal, "Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins," *Genes Dev.*, vol. **11**, no. 4, pp. 463–475, Feb. 1997.
- [97] A. J. Ridley, "Rho GTPases and cell migration," *J. Cell Sci.*, vol. **114**, no. Pt 15, pp. 2713–2722, Aug. 2001.
- [98] Y. Gu, M.-D. Filippi, J. A. Cancelas, J. E. Siefring, E. P. Williams, A. C. Jasti, C. E. Harris, A. W. Lee, R. Prabhakar, S. J. Atkinson, D. J. Kwiatkowski, and D. A. Williams, "Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases," *Science*, vol. **302**, no. 5644, pp. 445–449, Oct. 2003.
- [99] L. Wang, L. Yang, M.-D. Filippi, D. A. Williams, and Y. Zheng, "Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment," *Blood*, vol. **107**, no. 1, pp. 98–105, Jan. 2006.
- [100] M. J. Walmsley, S. K. T. Ooi, L. F. Reynolds, S. H. Smith, S. Ruf, A. Mathiot, L. Vanes, D. A. Williams, M. P. Cancro, and V. L. J. Tybulewicz, "Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling," *Science*, vol. **302**, no. 5644, pp. 459–462, Oct. 2003.
- [101] F. Guo, C. S. Velu, H. L. Grimes, and Y. Zheng, "Rho GTPase Cdc42 is essential for B-lymphocyte development and activation," *Blood*, vol. **114**, no. 14, pp. 2909–2916, Oct. 2009.
- [102] F. Caligaris-Cappio, L. Bergui, L. Tesio, G. Corbascio, F. Tousco, and P. C. Marchisio, "Cytoskeleton organization is aberrantly rearranged in the cells of B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia," *Blood*, vol. **67**, no. 1, pp. 233–239, Jan. 1986.
- [103] E. K. Miyoshi, P. L. Stewart, P. W. Kincade, M. B. Lee, A. A. Thompson, and R. Wall, "Aberrant expression and localization of the cytoskeleton-binding pp52 (LSP1) protein in hairy cell leukemia," *Leuk. Res.*, vol. **25**, no. 1, pp. 57–67, Jan. 2001.
- [104] X. Zhang, T. Machii, I. Matsumura, S. Ezoe, A. Kawasaki, H. Tanaka, S. Ueda, H. Sugahara, H. Shibayama, M. Mizuki, and Y. Kanakura, "Constitutively activated Rho guanosine triphosphatases regulate the growth and morphology of hairy cell leukemia cells," *Int. J. Hematol.*, vol. **77**, no. 3, pp. 263–273, Apr. 2003.
- [105] B. Chaigne-Delalande, L. Deuve, E. Reuzeau, C. Basoni, D. Lafarge, C. Varon, F. Tatin, G. Anies, R. Garand, I. Kramer, and E. Génot, "RhoGTPases and p53 are involved in the morphological appearance and interferon-alpha response of hairy cells," *Am. J. Pathol.*, vol. **168**, no. 2, pp. 562–573, Feb. 2006.
- [106] Z. Wang, E. Pedersen, A. Basse, T. Lefever, K. Peyrollier, S. Kapoor, Q. Mei, R. Karlsson, A. Chrostek-Grashoff, and C. Brakebusch, "Rac1 is crucial for Ras-dependent skin tumor formation by controlling Pak1-Mek-Erk hyperactivation and hyperproliferation in vivo," *Oncogene*, vol. 29, no. 23, pp. 3362–3373, Jun. 2010.
- [107] N. Kaneto, S. Yokoyama, Y. Hayakawa, S. Kato, H. Sakurai, and I. Saiki, "RAC1 inhibition as a therapeutic target for gefitinib-resistant non-small-cell lung cancer," *Cancer Sci.*, vol. **105**, no. 7, pp. 788–794, Jul. 2014.
- [108] H.-Y. Chen, Y. M. Yang, B. M. Stevens, and M. Noble, "Inhibition of redox/Fyn/c-Cbl pathway function by Cdc42 controls tumour initiation capacity and tamoxifen sensitivity in basal-like breast cancer cells," *EMBO Mol. Med.*, vol. **5**, no. 5, pp. 723–736, May 2013.

- [109] E. Dallery, S. Galiègue-Zouitina, M. Collyn-d'Hooghe, S. Quief, C. Denis, M. P. Hildebrand, D. Lantoine, C. Deweindt, H. Tilly, and C. Bastard, "TTF, a gene encoding a novel small G protein, fuses to the lymphoma-associated LAZ3 gene by t(3;4) chromosomal translocation," *Oncogene*, vol. **10**, no. 11, pp. 2171–2178, Jun. 1995.
- [110] S. Galiègue-Zouitina, L. Delestré, C. Dupont, X. Troussard, and C. S. Shelley, "Underexpression of RhoH in Hairy Cell Leukemia," *Cancer Res.*, vol. **68**, no. 12, pp. 4531–4540, Jun. 2008.
- [111] X. Li, X. Bu, B. Lu, H. Avraham, R. A. Flavell, and B. Lim, "The hematopoiesis-specific GTP-binding protein RhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function," *Mol. Cell. Biol.*, vol. **22**, no. 4, pp. 1158–1171, Feb. 2002.
- [112] S. Lahousse, A.-L. Smorowski, C. Denis, D. Lantoine, J.-P. Kerckaert, and S. Galiègue-Zouitina, "Structural features of hematopoiesis-specific RhoH/ARHH gene: high diversity of 5'-UTR in different hematopoietic lineages suggests a complex post-transcriptional regulation," *Gene*, vol. **343**, no. 1, pp. 55–68, Dec. 2004.
- [113] E. Dallery-Prudhomme, C. Roumier, C. Denis, C. Preudhomme, J. P. Kerckaert, and S. Galiègue-Zouitina, "Genomic structure and assignment of the RhoH/TTF small GTPase gene (ARHH) to 4p13 by in situ hybridization," *Genomics*, vol. **43**, no. 1, pp. 89–94, Jul. 1997.
- [114] L. Delestré, C. Berthon, B. Quesnel, M. Figeac, J.-P. Kerckaert, S. Galiègue-Zouitina, and C. S. Shelley, "Repression of the RHOH gene by JunD," *Biochem. J.*, vol. **437**, no. 1, pp. 75–88, Jul. 2011.
- [115] Y. Gu, H.-D. Chae, J. E. Sieftring, A. C. Jasti, D. A. Hildeman, and D. A. Williams, "RhoH GTPase recruits and activates Zap70 required for T cell receptor signaling and thymocyte development," *Nat. Immunol.*, vol. **7**, no. 11, pp. 1182–1190, Nov. 2006.
- [116] F. Fueller and K. F. Kubatzky, "The small GTPase RhoH is an atypical regulator of haematopoietic cells," *Cell Commun. Signal. CCS*, vol. **6**, p. 6, 2008.
- [117] Y. Gu, A. C. Jasti, M. Jansen, and J. E. Sieftring, "RhoH, a hematopoietic-specific Rho GTPase, regulates proliferation, survival, migration, and engraftment of hematopoietic progenitor cells," *Blood*, vol. **105**, no. 4, pp. 1467–1475, Feb. 2005.
- [118] H.-D. Chae, K. E. Lee, D. A. Williams, and Y. Gu, "Cross-talk between RhoH and Rac1 in regulation of actin cytoskeleton and chemotaxis of hematopoietic progenitor cells," *Blood*, vol. **111**, no. 5, pp. 2597–2605, Mar. 2008.
- [119] L. K. Cherry, X. Li, P. Schwab, B. Lim, and L. B. Klickstein, "RhoH is required to maintain the integrin LFA-1 in a nonadhesive state on lymphocytes," *Nat. Immunol.*, vol. **5**, no. 9, pp. 961–967, Sep. 2004.
- [120] T. Dorn, U. Kuhn, G. Bungartz, S. Stiller, M. Bauer, J. Ellwart, T. Peters, K. Scharffetter-Kochanek, M. Semmrich, M. Laschinger, B. Holzmann, W. E. F. Klinkert, P. T. Straten, T. Køllgaard, M. Sixt, and C. Brakebusch, "RhoH is important for positive thymocyte selection and T-cell receptor signaling," *Blood*, vol. **109**, no. 6, pp. 2346–2355, Mar. 2007.
- [121] H. Wang, X. Zeng, Z. Fan, and B. Lim, "RhoH plays distinct roles in T-cell migrations induced by different doses of SDF1 alpha," *Cell. Signal.*, vol. **22**, no. 7, pp. 1022–1032, Jul. 2010.
- [122] M. Matsumoto, K. Oyamada, H. Takahashi, T. Sato, S. Hatakeyama, and K. I. Nakayama, "Large-scale proteomic analysis of tyrosine-phosphorylation induced by T-

- cell receptor or B-cell receptor activation reveals new signaling pathways,” *Proteomics*, vol. **9**, no. 13, pp. 3549–3563, Jul. 2009.
- [123] T. Iwasaki, A. Katsumi, H. Kiyoi, R. Tanizaki, Y. Ishikawa, K. Ozeki, M. Kobayashi, A. Abe, T. Matsushita, T. Watanabe, M. Amano, T. Kojima, K. Kaibuchi, and T. Naoe, “Prognostic implication and biological roles of RhoH in acute myeloid leukaemia,” *Eur. J. Haematol.*, vol. **81**, no. 6, pp. 454–460, Dec. 2008.
- [124] A. Sanchez-Aguilera, I. Rattmann, D. Z. Drew, L. U. W. Müller, V. Summey, D. M. Lucas, J. C. Byrd, C. M. Croce, Y. Gu, J. A. Cancelas, P. Johnston, T. Moritz, and D. A. Williams, “Involvement of RhoH GTPase in the development of B-cell chronic lymphocytic leukemia,” *Leukemia*, vol. **24**, no. 1, pp. 97–104, Jan. 2010.
- [125] C. Preudhomme, C. Roumier, M. P. Hildebrand, E. Dallery-Prudhomme, D. Lantoine, J. L. Lai, A. Daudignon, C. Adenis, F. Bauters, P. Fenaux, J. P. Kerckaert, and S. Galiègue-Zouitina, “Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin’s lymphoma and multiple myeloma,” *Oncogene*, vol. **19**, no. 16, pp. 2023–2032, Apr. 2000.
- [126] J. Hiraga, A. Katsumi, T. Iwasaki, A. Abe, H. Kiyoi, T. Matsushita, T. Kinoshita, and T. Naoe, “Prognostic analysis of aberrant somatic hypermutation of RhoH gene in diffuse large B cell lymphoma,” *Leukemia*, vol. **21**, no. 8, pp. 1846–1847, Aug. 2007.
- [127] L. Pasqualucci, P. Neumeister, T. Goossens, G. Nanjangud, R. S. Chaganti, R. Küppers, and R. Dalla-Favera, “Hypermethylation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas,” *Nature*, vol. **412**, no. 6844, pp. 341–346, Jul. 2001.
- [128] A. Liso, D. Capello, T. Marafioti, E. Tiacci, M. Cerri, V. Distler, M. Paulli, A. Carbone, G. Delsol, E. Campo, S. Pileri, L. Pasqualucci, G. Gaidano, and B. Falini, “Aberrant somatic hypermutation in tumor cells of nodular-lymphocyte-predominant and classic Hodgkin lymphoma,” *Blood*, vol. **108**, no. 3, pp. 1013–1020, Aug. 2006.
- [129] R. Dijkman, C. P. Tensen, M. Buettner, G. Niedobitek, R. Willemze, and M. H. Vermeer, “Primary cutaneous follicle center lymphoma and primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, are both targeted by aberrant somatic hypermutation but demonstrate differential expression of AID,” *Blood*, vol. **107**, no. 12, pp. 4926–4929, Jun. 2006.
- [130] K. Nata, T. Takamura, T. Karasawa, T. Kumagai, W. Hashioka, A. Tohgo, H. Yonekura, S. Takasawa, S. Nakamura, and H. Okamoto, “Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): organization, nucleotide sequence and alternative splicing,” *Gene*, vol. **186**, no. 2, pp. 285–292, Feb. 1997.
- [131] E. Ferrero and F. Malavasi, “Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and aplysian ADP-ribosyl cyclase,” *J. Immunol.*, vol. **159**, no. 8, pp. 3858–3865, Oct. 1997.
- [132] K. G. Tirumurugan, B. N. Kang, R. A. Panettieri, D. N. Foster, T. F. Walseth, and M. S. Kannan, “Regulation of the cd38 promoter in human airway smooth muscle cells by TNF-alpha and dexamethasone,” *Respir. Res.*, vol. **9**, p. 26, 2008.
- [133] B.-N. Kang, K. G. Tirumurugan, D. A. Deshpande, Y. Amrani, R. A. Panettieri, T. F. Walseth, and M. S. Kannan, “Transcriptional regulation of CD38 expression by tumor necrosis factor-alpha in human airway smooth muscle cells: role of NF-kappaB and sensitivity to glucocorticoids,” *FASEB.*, vol. **20**, no. 7, pp. 1000–1002, May 2006.

- [134] K. G. Tirumurugaan, J. A. Jude, B. N. Kang, R. A. Panettieri, T. F. Walseth, and M. S. Kannan, "TNF- α induced CD38 expression in human airway smooth muscle cells: role of MAP kinases and transcription factors NF- κ B and AP-1," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. **292**, no. 6, pp. L1385–1395, Jun. 2007.
- [135] J. Drach, T. McQueen, H. Engel, M. Andreeff, K. A. Robertson, S. J. Collins, F. Malavasi, and K. Mehta, "Retinoic acid-induced expression of CD38 antigen in myeloid cells is mediated through retinoic acid receptor- α ," *Cancer Res.*, vol. **54**, no. 7, pp. 1746–1752, Apr. 1994.
- [136] H. Kishimoto, S. Hoshino, M. Otori, K. Kontani, H. Nishina, M. Suzawa, S. Kato, and T. Katada, "Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. Identification of retinoic acid response element in the first intron," *J. Biol. Chem.*, vol. **273**, no. 25, pp. 15429–15434, Jun. 1998.
- [137] A. Uruno, N. Noguchi, K. Matsuda, K. Nata, T. Yoshikawa, Y. Chikamatsu, H. Kagechika, H. Harigae, S. Ito, H. Okamoto, and A. Sugawara, "All-trans retinoic acid and a novel synthetic retinoid tamibarotene (Am80) differentially regulate CD38 expression in human leukemia HL-60 cells: possible involvement of protein kinase C- δ ," *J. Leukoc. Biol.*, vol. **90**, no. 2, pp. 235–247, Aug. 2011.
- [138] S. Aggarwal, S.-W. Kim, K. Cheon, F. H. Tabassam, J.-H. Yoon, and J. S. Koo, "Nonclassical action of retinoic acid on the activation of the cAMP response element-binding protein in normal human bronchial epithelial cells," *Mol. Biol. Cell*, vol. **17**, no. 2, pp. 566–575, Feb. 2006.
- [139] I. Saborit-Villarroya, T. Vaisitti, D. Rossi, G. D'Arena, G. Gaidano, F. Malavasi, and S. Deaglio, "E2A is a transcriptional regulator of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia," *Leukemia*, vol. **25**, no. 3, pp. 479–488, Mar. 2011.
- [140] S. Bürgler, A. Gimeno, A. Parente-Ribes, D. Wang, A. Os, S. Devereux, P. Jebsen, B. Bogen, G. E. Tjønnfjord, and L. A. Munthe, "Chronic lymphocytic leukemia cells express CD38 in response to Th1 cell-derived IFN- γ by a T-bet-dependent mechanism," *J. Immunol.*, vol. **194**, no. 2, pp. 827–835, Jan. 2015.
- [141] D. T. Patton, M. D. Wilson, W. C. Rowan, D. R. Soond, and K. Okkenhaug, "The PI3K p110 δ regulates expression of CD38 on regulatory T cells," *PloS One*, vol. **6**, no. 3, p. e17359, 2011.
- [142] J. A. Jude, M. Dileepan, S. Subramanian, J. Solway, R. A. Panettieri Jr, T. F. Walseth, and M. S. Kannan, "miR-140-3p regulation of TNF- α -induced CD38 expression in human airway smooth muscle cells," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. **303**, no. 5, pp. L460–468, Sep. 2012.
- [143] M. Dileepan, J. A. Jude, S. P. Rao, T. F. Walseth, R. A. Panettieri, S. Subramanian, and M. S. Kannan, "MicroRNA-708 regulates CD38 expression through signaling pathways JNK MAP kinase and PTEN/AKT in human airway smooth muscle cells," *Respir. Res.*, vol. **15**, p. 107, 2014.
- [144] E. L. Reinherz, P. C. Kung, G. Goldstein, R. H. Levey, and S. F. Schlossman, "Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. **77**, no. 3, pp. 1588–1592, Mar. 1980.
- [145] S. Deaglio, S. Aydin, T. Vaisitti, L. Bergui, and F. Malavasi, "CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target," *Trends Mol. Med.*, vol. **14**, no. 5, pp. 210–218, May 2008.

- [146] Y. S. Cho, M. K. Han, Y. B. Choi, Y. Yun, J. Shin, and U. H. Kim, "Direct interaction of the CD38 cytoplasmic tail and the Lck SH2 domain. Cd38 transduces T cell activation signals through associated Lck," *J. Biol. Chem.*, vol. **275**, no. 3, pp. 1685–1690, Jan. 2000.
- [147] Y. Gao and K. Mehta, "N-linked glycosylation of CD38 is required for its structure stabilization but not for membrane localization," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. **295**, no. 1–2, pp. 1–7, Jan. 2007.
- [148] M. Orciani, O. Trubiani, S. Guarnieri, E. Ferrero, and R. Di Primio, "CD38 is constitutively expressed in the nucleus of human hematopoietic cells," *J. Cell. Biochem.*, vol. **105**, no. 3, pp. 905–912, Oct. 2008.
- [149] O. Trubiani, S. Guarnieri, E. Eleuterio, F. Di Giuseppe, M. Orciani, S. Angelucci, and R. Di Primio, "Insights into nuclear localization and dynamic association of CD38 in Raji and K562 cells," *J. Cell. Biochem.*, vol. **103**, no. 4, pp. 1294–1308, Mar. 2008.
- [150] M. T. Zilber, S. Gregory, R. Mallone, S. Deaglio, F. Malavasi, D. Charron, and C. Gelin, "CD38 expressed on human monocytes: a coaccessory molecule in the superantigen-induced proliferation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. **97**, no. 6, pp. 2840–2845, Mar. 2000.
- [151] L. Frasca, G. Fedele, S. Deaglio, C. Capuano, R. Palazzo, T. Vaisitti, F. Malavasi, and C. M. Ausiello, "CD38 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells," *Blood*, vol. **107**, no. 6, pp. 2392–2399, Mar. 2006.
- [152] C. M. Ausiello, A. la Sala, C. Ramoni, F. Urbani, A. Funaro, and F. Malavasi, "Secretion of IFN-gamma, IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-10 cytokines after activation of human purified T lymphocytes upon CD38 ligation," *Cell. Immunol.*, vol. **173**, no. 2, pp. 192–197, Nov. 1996.
- [153] J. C. Rodríguez-Alba, M. E. Moreno-García, C. Sandoval-Montes, V. H. Rosales-Garcia, and L. Santos-Argumedo, "CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen," *Blood*, vol. **111**, no. 7, pp. 3644–3652, Apr. 2008.
- [154] M. Zubiaur, M. Izquierdo, C. Terhorst, F. Malavasi, and J. Sancho, "CD38 ligation results in activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase and the CD3-zeta/zeta-associated protein-70 signaling pathways in Jurkat T lymphocytes," *J. Immunol.*, vol. **159**, no. 1, pp. 193–205, Jul. 1997.
- [155] A. Kitanaka, C. Ito, E. Coustan-Smith, and D. Campana, "CD38 ligation in human B cell progenitors triggers tyrosine phosphorylation of CD19 and association of CD19 with lyn and phosphatidylinositol 3-kinase," *J. Immunol.*, vol. **159**, no. 1, pp. 184–192, Jul. 1997.
- [156] F. Vences-Catalán, R. Rajapaksa, S. Levy, and L. Santos-Argumedo, "The CD19/CD81 complex physically interacts with CD38 but is not required to induce proliferation in mouse B lymphocytes," *Immunology*, vol. **137**, no. 1, pp. 48–55, Sep. 2012.
- [157] D. A. Cockayne, T. Muchamuel, J. C. Grimaldi, H. Muller-Steffner, T. D. Randall, F. E. Lund, R. Murray, F. Schuber, and M. C. Howard, "Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses," *Blood*, vol. **92**, no. 4, pp. 1324–1333, Aug. 1998.
- [158] F. E. Lund, N. Yu, K. M. Kim, M. Reth, and M. C. Howard, "Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression," *J. Immunol.*, vol. **157**, no. 4, pp. 1455–1467, Aug. 1996.
- [159] A. Kitanaka, C. Ito, H. Nishigaki, and D. Campana, "CD38-mediated growth suppression of B-cell progenitors requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase and involves

- its association with the protein product of the c-cbl proto-oncogene," *Blood*, vol. **88**, no. 2, pp. 590–598, Jul. 1996.
- [160] O. Silvennoinen, H. Nishigaki, A. Kitanaka, M. Kumagai, C. Ito, F. Malavasi, Q. Lin, M. E. Conley, and D. Campana, "CD38 signal transduction in human B cell precursors. Rapid induction of tyrosine phosphorylation, activation of syk tyrosine kinase, and phosphorylation of phospholipase C-gamma and phosphatidylinositol 3-kinase," *J. Immunol.*, vol. **156**, no. 1, pp. 100–107, Jan. 1996.
- [161] F. E. Lund, H. Muller-Steffner, H. Romero-Ramirez, M. E. Moreno-García, S. Partida-Sánchez, M. Makris, N. J. Oppenheimer, L. Santos-Argumedo, and F. Schuber, "CD38 induces apoptosis of a murine pro-B leukemic cell line by a tyrosine kinase-dependent but ADP-ribosyl cyclase- and NAD glycohydrolase-independent mechanism," *Int. Immunol.*, vol. **18**, no. 7, pp. 1029–1042, Jul. 2006.
- [162] L. Santos-Argumedo, C. Teixeira, G. Preece, P. A. Kirkham, and R. M. Parkhouse, "A B lymphocyte surface molecule mediating activation and protection from apoptosis via calcium channels," *J. Immunol.*, vol. **151**, no. 6, pp. 3119–3130, Sep. 1993.
- [163] M. E. Moreno-García, L. N. López-Bojórques, A. Zentella, L. A. Humphries, D. J. Rawlings, and L. Santos-Argumedo, "CD38 signaling regulates B lymphocyte activation via a phospholipase C (PLC)-gamma 2-independent, protein kinase C, phosphatidylcholine-PLC, and phospholipase D-dependent signaling cascade," *J. Immunol.*, vol. **174**, no. 5, pp. 2687–2695, Mar. 2005.
- [164] S. Zupo, E. Rugari, M. Dono, G. Taborelli, F. Malavasi, and M. Ferrarini, "CD38 signaling by agonistic monoclonal antibody prevents apoptosis of human germinal center B cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. **24**, no. 5, pp. 1218–1222, May 1994.
- [165] K. Kontani, I. Kukimoto, H. Nishina, S. Hoshino, O. Hazeki, Y. Kanaho, and T. Katada, "Tyrosine phosphorylation of the c-cbl proto-oncogene product mediated by cell surface antigen CD38 in HL-60 cells," *J. Biol. Chem.*, vol. **271**, no. 3, pp. 1534–1537, Jan. 1996.
- [166] M. Howard, J. C. Grimaldi, J. F. Bazan, F. E. Lund, L. Santos-Argumedo, R. M. Parkhouse, T. F. Walseth, and H. C. Lee, "Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38," *Science*, vol. **262**, no. 5136, pp. 1056–1059, Nov. 1993.
- [167] F. E. Lund, "Signaling properties of CD38 in the mouse immune system: enzyme-dependent and -independent roles in immunity," *Mol. Med. Camb. Mass*, vol. **12**, no. 11–12, pp. 328–333, Dec. 2006.
- [168] A. Galione, H. C. Lee, and W. B. Busa, "Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose," *Science*, vol. **253**, no. 5024, pp. 1143–1146, Sep. 1991.
- [169] A. L. Perraud, A. Fleig, C. A. Dunn, L. A. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A. J. Stokes, Q. Zhu, M. J. Bessman, R. Penner, J. P. Kinet, and A. M. Scharenberg, "ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology," *Nature*, vol. **411**, no. 6837, pp. 595–599, May 2001.
- [170] Y. Sano, K. Inamura, A. Miyake, S. Mochizuki, H. Yokoi, H. Matsushime, and K. Furuichi, "Immunocyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2," *Science*, vol. **293**, no. 5533, pp. 1327–1330, Aug. 2001.
- [171] M. Kolisek, A. Beck, A. Fleig, and R. Penner, "Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels," *Mol. Cell*, vol. **18**, no. 1, pp. 61–69, Apr. 2005.

- [172] H. C. Lee and R. Aarhus, "A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose," *J. Biol. Chem.*, vol. **270**, no. 5, pp. 2152–2157, Feb. 1995.
- [173] N. Chidambaram and C. F. Chang, "Functional role of glycosylation on the recombinant CD38/ADP-ribosyl cyclase in CHO cells," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. **30**, no. 9, pp. 1011–1018, Sep. 1998.
- [174] L. Franco, E. Zocchi, C. Usai, L. Guida, S. Bruzzone, A. Costa, and A. De Flora, "Paracrine roles of NAD⁺ and cyclic ADP-ribose in increasing intracellular calcium and enhancing cell proliferation of 3T3 fibroblasts," *J. Biol. Chem.*, vol. **276**, no. 24, pp. 21642–21648, Jun. 2001.
- [175] S. Umar, F. Malavasi, and K. Mehta, "Post-translational modification of CD38 protein into a high molecular weight form alters its catalytic properties," *J. Biol. Chem.*, vol. **271**, no. 27, pp. 15922–15927, Jul. 1996.
- [176] M. Hara-Yokoyama, M. Kukimoto-Niino, K. Terasawa, S. Harumiya, K. A. Podyma-Inoue, N. Hino, K. Sakamoto, S. Itoh, N. Hashii, Y. Hiruta, N. Kawasaki, C. Mishima-Tsumagari, Y. Kaitsu, T. Matsumoto, M. Wakiyama, M. Shirouzu, T. Kasama, H. Takayanagi, N. Utsunomiya-Tate, K. Takatsu, T. Katada, Y. Hirabayashi, S. Yokoyama, and M. Yanagishita, "Tetrameric interaction of the ectoenzyme CD38 on the cell surface enables its catalytic and raft-association activities," *Struct. Lond. Engl.* 1993, vol. **20**, no. 9, pp. 1585–1595, Sep. 2012.
- [177] Y. J. Zhao, C. M. C. Lam, and H. C. Lee, "The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations," *Sci. Signal.*, vol. **5**, no. 241, p. ra67, 2012.
- [178] R. Mallone, S. Ferrua, M. Morra, E. Zocchi, K. Mehta, L. D. Notarangelo, and F. Malavasi, "Characterization of a CD38-like 78-kilodalton soluble protein released from B cell lines derived from patients with X-linked agammaglobulinemia," *J. Clin. Invest.*, vol. **101**, no. 12, pp. 2821–2830, Jun. 1998.
- [179] M. J. Lebedev, N. I. Egorova, M. N. Sholkina, S. A. Vilkov, A. J. Baryshnikov, and V. V. Novikov, "Serum levels of different forms of soluble CD38 antigen in burned patients," *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.*, vol. **30**, no. 6, pp. 552–556, Sep. 2004.
- [180] S. Partida-Sánchez, D. A. Cockayne, S. Monard, E. L. Jacobson, N. Oppenheimer, B. Garvy, K. Kusser, S. Goodrich, M. Howard, A. Harmsen, T. D. Randall, and F. E. Lund, "Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo," *Nat. Med.*, vol. **7**, no. 11, pp. 1209–1216, Nov. 2001.
- [181] S. Partida-Sánchez, P. Iribarren, M. E. Moreno-García, J.-L. Gao, P. M. Murphy, N. Oppenheimer, J. M. Wang, and F. E. Lund, "Chemotaxis and calcium responses of phagocytes to formyl peptide receptor ligands is differentially regulated by cyclic ADP ribose," *J. Immunol.*, vol. **172**, no. 3, pp. 1896–1906, Feb. 2004.
- [182] S. Partida-Sánchez, S. Goodrich, K. Kusser, N. Oppenheimer, T. D. Randall, and F. E. Lund, "Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity," *Immunity*, vol. **20**, no. 3, pp. 279–291, Mar. 2004.
- [183] S.-Y. Rah, K.-H. Park, M.-K. Han, M.-J. Im, and U.-H. Kim, "Activation of CD38 by interleukin-8 signaling regulates intracellular Ca²⁺ level and motility of lymphokine-activated killer cells," *J. Biol. Chem.*, vol. **280**, no. 4, pp. 2888–2895, Jan. 2005.
- [184] U. Dianzani, A. Funaro, D. DiFranco, G. Garbarino, M. Bragardo, V. Redoglia, D. Buonfiglio, L. B. De Monte, A. Pileri, and F. Malavasi, "Interaction between

- endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule," *J. Immunol.*, vol. **153**, no. 3, pp. 952–959, Aug. 1994.
- [185] S. Deaglio, M. Morra, R. Mallone, C. M. Ausiello, E. Prager, G. Garbarino, U. Dianzani, H. Stockinger, and F. Malavasi, "Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member," *J. Immunol.*, vol. **160**, no. 1, pp. 395–402, Jan. 1998.
- [186] H. Nishina, K. Inageda, K. Takahashi, S. Hoshino, K. Ikeda, and T. Katada, "Cell surface antigen CD38 identified as ecto-enzyme of NAD glycohydrolase has hyaluronate-binding activity," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. **203**, no. 2, pp. 1318–1323, Sep. 1994.
- [187] D. Jin, H.-X. Liu, H. Hirai, T. Torashima, T. Nagai, O. Lopatina, N. A. Shnayder, K. Yamada, M. Noda, T. Seike, K. Fujita, S. Takasawa, S. Yokoyama, K. Koizumi, Y. Shiraishi, S. Tanaka, M. Hashii, T. Yoshihara, K. Higashida, M. S. Islam, N. Yamada, K. Hayashi, N. Noguchi, I. Kato, H. Okamoto, A. Matsushima, A. Salmina, T. Munesue, N. Shimizu, S. Mochida, M. Asano, and H. Higashida, "CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion," *Nature*, vol. **446**, no. 7131, pp. 41–45, Mar. 2007.
- [188] S. B. Algoe and B. M. Way, "Evidence for a role of the oxytocin system, indexed by genetic variation in CD38, in the social bonding effects of expressed gratitude," *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.*, vol. **9**, no. 12, pp. 1855–1861, Dec. 2014.
- [189] F. Ceroni, A. Sagar, N. H. Simpson, A. J. T. Gawthrope, D. F. Newbury, D. Pinto, S. M. Francis, D. C. Tessman, E. H. Cook, A. P. Monaco, E. Maestrini, A. T. Pagnamenta, and S. Jacob, "A deletion involving CD38 and BST1 results in a fusion transcript in a patient with autism and asthma," *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.*, vol. **7**, no. 2, pp. 254–263, Apr. 2014.
- [190] I. Kato, Y. Yamamoto, M. Fujimura, N. Noguchi, S. Takasawa, and H. Okamoto, "CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose, [Ca²⁺]_i, and insulin secretion," *J. Biol. Chem.*, vol. **274**, no. 4, pp. 1869–1872, Jan. 1999.
- [191] F. Ikehata, J. Satoh, K. Nata, A. Tohgo, T. Nakazawa, I. Kato, S. Kobayashi, T. Akiyama, S. Takasawa, T. Toyota, and H. Okamoto, "Autoantibodies against CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) that impair glucose-induced insulin secretion in noninsulin-dependent diabetes patients," *J. Clin. Invest.*, vol. **102**, no. 2, pp. 395–401, Jul. 1998.
- [192] K. Yagui, F. Shimada, M. Mimura, N. Hashimoto, Y. Suzuki, Y. Tokuyama, K. Nata, A. Tohgo, F. Ikehata, S. Takasawa, H. Okamoto, H. Makino, Y. Saito, and A. Kanatsuka, "A missense mutation in the CD38 gene, a novel factor for insulin secretion: association with Type II diabetes mellitus in Japanese subjects and evidence of abnormal function when expressed in vitro," *Diabetologia*, vol. **41**, no. 9, pp. 1024–1028, Sep. 1998.
- [193] A. Savarino, T. Bensi, A. Chiocchetti, F. Bottarel, R. Mesturini, E. Ferrero, L. Calosso, S. Deaglio, E. Ortolan, S. Buttò, A. Cafaro, T. Katada, B. Ensoli, F. Malavasi, and U. Dianzani, "Human CD38 interferes with HIV-1 fusion through a sequence homologous to the V3 loop of the viral envelope glycoprotein gp120," *FASEB.*, vol. **17**, no. 3, pp. 461–463, Mar. 2003.
- [194] T. Bensi, F. Mele, M. Ferretti, S. Norelli, S. El Daker, A. Chiocchetti, J. Maria Rojo, R. Cauda, U. Dianzani, and A. Savarino, "Evaluation of the antiretroviral effects of a PEG-conjugated peptide derived from human CD38," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. **13**, no. 2, pp. 141–152, Feb. 2009.

- [195] A. Savarino, F. Bottarel, F. Malavasi, and U. Dianzani, "Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions?," *AIDS Lond. Engl.*, vol. **14**, no. 9, pp. 1079–1089, Jun. 2000.
- [196] D. A. Deshpande, T. A. White, S. Dogan, T. F. Walseth, R. A. Panettieri, and M. S. Kannan, "CD38/cyclic ADP-ribose signaling: role in the regulation of calcium homeostasis in airway smooth muscle," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. **288**, no. 5, pp. L773–788, May 2005.
- [197] D. A. Deshpande, T. F. Walseth, R. A. Panettieri, and M. S. Kannan, "CD38/cyclic ADP-ribose-mediated Ca²⁺ signaling contributes to airway smooth muscle hyper-responsiveness," *FASEB.*, vol. **17**, no. 3, pp. 452–454, Mar. 2003.
- [198] R. Costello, F. Mallet, H. Chambost, D. Sainty, C. Arnoulet, J. A. Gastaut, and D. Olive, "The immunophenotype of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): reduced immunogenicity and high frequency of CD34+/CD38- leukemic progenitors," *Leukemia*, vol. **13**, no. 10, pp. 1513–1518, Oct. 1999.
- [199] V. T. Hoang, A. Zepeda-Moreno, and A. D. Ho, "Identification of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia and their clinical relevance," *Biotechnol. J.*, vol. **7**, no. 6, pp. 779–788, Jun. 2012.
- [200] M. Konopleva, Z. Estrov, S. Zhao, M. Andreeff, and K. Mehta, "Ligation of cell surface CD38 protein with agonistic monoclonal antibody induces a cell growth signal in myeloid leukemia cells," *J. Immunol.*, vol. **161**, no. 9, pp. 4702–4708, Nov. 1998.
- [201] E. Todisco, T. Suzuki, K. Srivannaboon, E. Coustan-Smith, S. C. Raimondi, F. G. Behm, A. Kitanaka, and D. Campana, "CD38 ligation inhibits normal and leukemic myelopoiesis," *Blood*, vol. **95**, no. 2, pp. 535–542, Jan. 2000.
- [202] N. Gallay, L. Anani, A. Lopez, P. Colombat, C. Binet, J. Domenech, B. B. Weksler, F. Malavasi, and O. Herault, "The role of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31) and CD38 antigens in marrow microenvironmental retention of acute myelogenous leukemia cells," *Cancer Res.*, vol. **67**, no. 18, pp. 8624–8632, Sep. 2007.
- [203] Y. Khagi and T. M. Mark, "Potential role of daratumumab in the treatment of multiple myeloma," *OncoTargets Ther.*, vol. **7**, pp. 1095–1100, 2014.
- [204] G. Brachtel, J. Piñón Hofbauer, R. Greil, and T. N. Hartmann, "The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia," *Ann. Hematol.*, vol. **93**, no. 3, pp. 361–374, Mar. 2014.
- [205] M. de Weers, Y.-T. Tai, M. S. van der Veer, J. M. Bakker, T. Vink, D. C. H. Jacobs, L. A. Oomen, M. Peipp, T. Valerius, J. W. Slootstra, T. Mutis, W. K. Bleeker, K. C. Anderson, H. M. Lokhorst, J. G. J. van de Winkel, and P. W. H. I. Parren, "Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors," *J. Immunol.*, vol. **186**, no. 3, pp. 1840–1848, Feb. 2011.
- [206] M. B. Overdijk, S. Verploegen, M. Bögels, M. van Egmond, J. J. Lammerts van Bueren, T. Mutis, R. W. J. Groen, E. Breij, A. C. M. Martens, W. K. Bleeker, and P. W. H. I. Parren, "Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma," *mAbs*, vol. **7**, no. 2, pp. 311–321, 2015.
- [207] M. S. van der Veer, M. de Weers, B. van Kessel, J. M. Bakker, S. Wittebol, P. W. H. I. Parren, H. M. Lokhorst, and T. Mutis, "The therapeutic human CD38 antibody daratumumab improves the anti-myeloma effect of newly emerging multi-drug therapies," *Blood Cancer J.*, vol. **1**, no. 10, p. 41, Oct. 2011.

- [208] J. Deckert, M.-C. Wetzel, L. M. Bartle, A. Skaletskaya, V. S. Goldmacher, F. Vallée, Q. Zhou-Liu, P. Ferrari, S. Pouzieux, C. Lahoute, C. Dumontet, A. Plesa, M. Chiron, P. Lejeune, T. Chittenden, P. U. Park, and V. Blanc, "SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies," *Clin. Cancer Res.*, vol. **20**, no. 17, pp. 4574–4583, Sep. 2014.
- [209] L. Antonioli, C. Blandizzi, P. Pacher, and G. Haskó, "Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine," *Nat. Rev. Cancer*, vol. **13**, no. 12, pp. 842–857, Dec. 2013.
- [210] V. Quarona, V. Ferri, A. Chillemi, M. Bolzoni, C. Mancini, G. Zaccarello, I. Roato, F. Morandi, D. Marimpietri, G. Faccani, E. Martella, V. Pistoia, N. Giuliani, A. L. Horenstein, and F. Malavasi, "Unraveling the contribution of ectoenzymes to myeloma life and survival in the bone marrow niche," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. **1335**, pp. 10–22, Jan. 2015.
- [211] C. B. Kost, J. T. Holden, and K. P. Mann, "Marginal zone B-cell lymphoma: a retrospective immunophenotypic analysis," *Cytometry B Clin. Cytom.*, vol. **74**, no. 5, pp. 282–286, Sep. 2008.
- [212] K. R. Rai, A. Sawitsky, E. P. Cronkite, A. D. Chanana, R. N. Levy, and B. S. Pasternack, "Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia," *Blood*, vol. **46**, no. 2, pp. 219–234, Aug. 1975.
- [213] J. L. Binet, A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguet, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M. T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbes, and F. Gremy, "A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis," *Cancer*, vol. **48**, no. 1, pp. 198–206, Jul. 1981.
- [214] T. J. Hamblin, Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier, and F. K. Stevenson, "Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia," *Blood*, vol. **94**, no. 6, pp. 1848–1854, Sep. 1999.
- [215] A. Wiestner, A. Rosenwald, T. S. Barry, G. Wright, R. E. Davis, S. E. Henrickson, H. Zhao, R. E. Ibbotson, J. A. Orchard, Z. Davis, M. Stetler-Stevenson, M. Raffeld, D. C. Arthur, G. E. Marti, W. H. Wilson, T. J. Hamblin, D. G. Oscier, and L. M. Staudt, "ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile," *Blood*, vol. **101**, no. 12, pp. 4944–4951, Jun. 2003.
- [216] R. N. Damle, T. Wail, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S. L. Allen, A. Buchbinder, D. Budman, K. Dittmar, J. Kolitz, S. M. Lichtman, P. Schulman, V. P. Vinciguerra, K. R. Rai, M. Ferrarini, and N. Chiorazzi, "Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia," *Blood*, vol. **94**, no. 6, pp. 1840–1847, Sep. 1999.
- [217] S. Ibrahim, M. Keating, K. A. Do, S. O'Brien, Y. O. Huh, I. Jilani, S. Lerner, H. M. Kantarjian, and M. Albitar, "CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia," *Blood*, vol. **98**, no. 1, pp. 181–186, Jul. 2001.
- [218] Z. Matrai, "CD38 as a prognostic marker in CLL," *Hematol. Amst. Neth.*, vol. **10**, no. 1, pp. 39–46, Feb. 2005.
- [219] C. Pepper, R. Ward, T. T. Lin, P. Brennan, J. Starczynski, M. Musson, C. Rowntree, P. Bentley, K. Mills, G. Pratt, and C. Fegan, "Highly purified CD38+ and CD38- sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene

- expression signatures despite their monoclonal origin," *Leukemia*, vol. **21**, no. 4, pp. 687–696, Apr. 2007.
- [220] S. Deaglio, T. Vaisitti, L. Bergui, L. Bonello, A. L. Horenstein, L. Tamagnone, L. Boumsell, and F. Malavasi, "CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival," *Blood*, vol. **105**, no. 8, pp. 3042–3050, Apr. 2005.
- [221] S. Deaglio, T. Vaisitti, S. Aydin, L. Bergui, G. D'Arena, L. Bonello, P. Omedé, M. Scatolini, O. Jaksic, G. Chiorino, D. Efremov, and F. Malavasi, "CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential," *Blood*, vol. **110**, no. 12, pp. 4012–4021, Dec. 2007.
- [222] S. Deaglio, R. Mallone, G. Baj, A. Arnulfo, N. Surico, U. Dianzani, K. Mehta, and F. Malavasi, "CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes," *Chem. Immunol.*, vol. **75**, pp. 99–120, 2000.
- [223] S. Deaglio, S. Aydin, M. M. Grand, T. Vaisitti, L. Bergui, G. D'Arena, G. Chiorino, and F. Malavasi, "CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells," *Mol. Med. Camb. Mass*, vol. **16**, no. 3–4, pp. 87–91, Mar. 2010.
- [224] O. Jaksic, M. M. K. Paro, I. Kardum Skelin, R. Kusec, V. Pejisa, and B. Jaksic, "CD38 on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells has higher expression in lymph nodes than in peripheral blood or bone marrow," *Blood*, vol. **103**, no. 5, pp. 1968–1969, Mar. 2004.
- [225] T. Vaisitti, S. Aydin, D. Rossi, F. Cottino, L. Bergui, G. D'Arena, L. Bonello, A. L. Horenstein, P. Brennan, C. Pepper, G. Gaidano, F. Malavasi, and S. Deaglio, "CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells," *Leukemia*, vol. **24**, no. 5, pp. 958–969, May 2010.
- [226] T. Vaisitti, V. Audrito, S. Serra, R. Buonincontri, G. Sociali, E. Mannino, A. Pagnani, A. Zucchetto, E. Tissino, C. Vitale, M. Coscia, C. Usai, C. Pepper, V. Gattei, S. Bruzzone, and S. Deaglio, "The enzymatic activities of CD38 enhance CLL growth and trafficking: implications for therapeutic targeting," *Leukemia*, vol. **29**, no. 2, pp. 356–368, Feb. 2015.
- [227] G. Juliusson, R. Lenkei, and J. Liliemark, "Flow cytometry of blood and bone marrow cells from patients with hairy cell leukemia: phenotype of hairy cells and lymphocyte subsets after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine," *Blood*, vol. **83**, no. 12, pp. 3672–3681, Jun. 1994.
- [228] R. C. Friedman, K. K.-H. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel, "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs," *Genome Res.*, vol. **19**, no. 1, pp. 92–105, Jan. 2009.
- [229] D. M. Garcia, D. Baek, C. Shin, G. W. Bell, A. Grimson, and D. P. Bartel, "Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsi-6 and other microRNAs," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. **18**, no. 10, pp. 1139–1146, Oct. 2011.
- [230] J. Massagué, J. Seoane, and D. Wotton, "Smad transcription factors," *Genes Dev.*, vol. **19**, no. 23, pp. 2783–2810, Dec. 2005.
- [231] X. Li, S. Nie, C. Chang, T. Qiu, and X. Cao, "Smads oppose Hox transcriptional activities," *Exp. Cell Res.*, vol. **312**, no. 6, pp. 854–864, Apr. 2006.
- [232] D.-W. Kim and A. B. Lassar, "Smad-dependent recruitment of a histone deacetylase/Sin3A complex modulates the bone morphogenetic protein-dependent transcriptional repressor activity of Nkx3.2," *Mol. Cell. Biol.*, vol. **23**, no. 23, pp. 8704–8717, Dec. 2003.

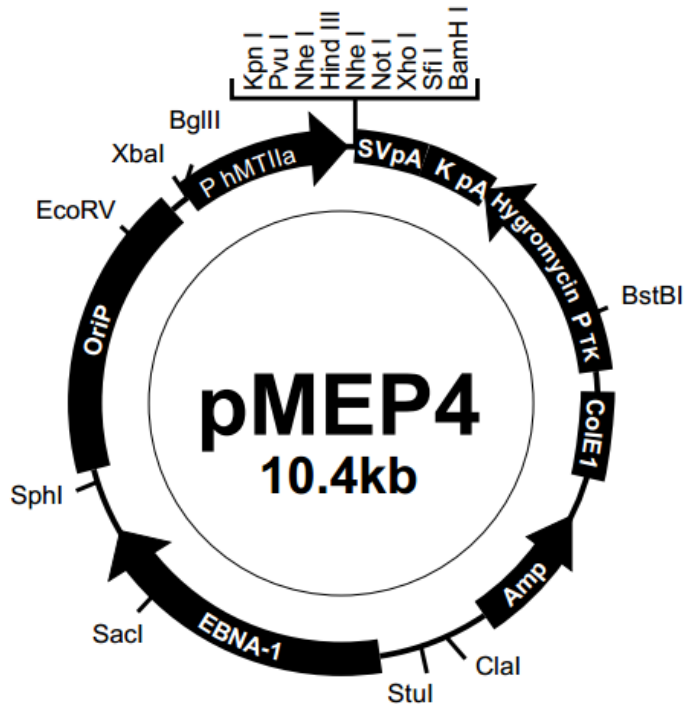
- [233] O. Korchynskyi and P. ten Dijke, "Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter," *J. Biol. Chem.*, vol. **277**, no. 7, pp. 4883–4891, Feb. 2002.
- [234] K. A. Henningfeld, S. Rastegar, G. Adler, and W. Knöchel, "Smad1 and Smad4 are components of the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-induced transcription complex of the Xvent-2B promoter," *J. Biol. Chem.*, vol. **275**, no. 29, pp. 21827–21835, Jul. 2000.
- [235] L. Zawel, J. L. Dai, P. Buckhaults, S. Zhou, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and S. E. Kern, "Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators," *Mol. Cell*, vol. **1**, no. 4, pp. 611–617, Mar. 1998.
- [236] L. J. Jonk, S. Itoh, C. H. Heldin, P. ten Dijke, and W. Kruijer, "Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer," *J. Biol. Chem.*, vol. **273**, no. 33, pp. 21145–21152, Aug. 1998.
- [237] V. Mostert, S. Wolff, I. Dreher, J. Köhrle, and J. Abel, "Identification of an element within the promoter of human selenoprotein P responsive to transforming growth factor-beta," *Eur. J. Biochem. FEBS*, vol. **268**, no. 23, pp. 6176–6181, Dec. 2001.
- [238] M. E. Greenberg and T. P. Bender, "Identification of newly transcribed RNA," *Curr. Protoc. Mol. Biol. Ed. Frederick M Ausubel Al*, vol. **Chapter 4**, p. Unit 4.10, Apr. 2007.
- [239] X. Wu and G. Brewer, "The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0," *Gene*, vol. **500**, no. 1, pp. 10–21, May 2012.
- [240] A. M. Zubiaga, J. G. Belasco, and M. E. Greenberg, "The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. **15**, no. 4, pp. 2219–2230, Apr. 1995.
- [241] I. López de Silanes, M. Zhan, A. Lal, X. Yang, and M. Gorospe, "Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. **101**, no. 9, pp. 2987–2992, Mar. 2004.
- [242] A. Barker, M. R. Epis, C. J. Porter, B. R. Hopkins, M. C. J. Wilce, J. A. Wilce, K. M. Giles, and P. J. Leedman, "Sequence requirements for RNA binding by HuR and AUF1," *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. **151**, no. 4, pp. 423–437, Apr. 2012.
- [243] J. van der Oost, "Molecular biology. New tool for genome surgery," *Science*, vol. **339**, no. 6121, pp. 768–770, Feb. 2013.
- [244] Y.-F. Chang, J. S. Imam, and M. F. Wilkinson, "The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. **76**, pp. 51–74, 2007.
- [245] P. E. M. Patten, A. G. S. Buggins, J. Richards, A. Wotherspoon, J. Salisbury, G. J. Mufti, T. J. Hamblin, and S. Devereux, "CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment," *Blood*, vol. **111**, no. 10, pp. 5173–5181, May 2008.
- [246] O. Maksimenko and P. Georgiev, "Mechanisms and proteins involved in long-distance interactions," *Front. Genet.*, vol. **5**, p. 28, 2014.
- [247] B. El Kaderi, S. Medler, and A. Ansari, "Analysis of interactions between genomic loci through Chromosome Conformation Capture (3C)," *Curr. Protoc. Cell Biol. Editor. Board Juan Bonifacino Al*, vol. **Chapter 22**, p. Unit22.15, Sep. 2012.
- [248] N. Poret, Q. Fu, S. Guihard, M. Cheok, K. Miller, G. Zeng, B. Quesnel, X. Troussard, S. Galiegue-Zouitina, and C. S. Shelley, "CD38 in Hairy Cell Leukemia is a Marker of Poor Prognosis and a New Target for Therapy," *Cancer Res.*, Jul. 2015.

- [249] Y. T. Ju, A. C. Chang, B. R. She, M. L. Tsaur, H. M. Hwang, C. C. Chao, S. N. Cohen, and S. Lin-Chao, "gas7: A gene expressed preferentially in growth-arrested fibroblasts and terminally differentiated Purkinje neurons affects neurite formation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. **95**, no. 19, pp. 11423–11428, Sep. 1998.
- [250] M. Hester, J. C. Thompson, J. Mills, Y. Liu, H. M. El-Hodiri, and M. Weinstein, "Smad1 and Smad8 function similarly in mammalian central nervous system development," *Mol. Cell. Biol.*, vol. **25**, no. 11, pp. 4683–4692, Jun. 2005.
- [251] K. R. Calvo, P. S. Knoepfler, D. B. Sykes, M. P. Pasillas, and M. P. Kamps, "Meis1a suppresses differentiation by G-CSF and promotes proliferation by SCF: potential mechanisms of cooperativity with Hoxa9 in myeloid leukemia," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. **98**, no. 23, pp. 13120–13125, Nov. 2001.
- [252] S. Wei, S. Nandi, V. Chitu, Y.-G. Yeung, W. Yu, M. Huang, L. T. Williams, H. Lin, and E. R. Stanley, "Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells," *J. Leukoc. Biol.*, vol. **88**, no. 3, pp. 495–505, Sep. 2010.
- [253] C. N. Wrobel, J. Debnath, E. Lin, S. Beausoleil, M. F. Roussel, and J. S. Brugge, "Autocrine CSF-1R activation promotes Src-dependent disruption of mammary epithelial architecture," *J. Cell Biol.*, vol. **165**, no. 2, pp. 263–273, Apr. 2004.
- [254] J. Sunayama, Y. Ando, N. Itoh, A. Tomiyama, K. Sakurada, A. Sugiyama, D. Kang, F. Tashiro, Y. Gotoh, Y. Kuchino, and C. Kitanaka, "Physical and functional interaction between BH3-only protein Hrk and mitochondrial pore-forming protein p32," *Cell Death Differ.*, vol. **11**, no. 7, pp. 771–781, Jul. 2004.
- [255] H. Puthalakath, A. Villunger, L. A. O'Reilly, J. G. Beaumont, L. Coultas, R. E. Cheney, D. C. Huang, and A. Strasser, "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis," *Science*, vol. **293**, no. 5536, pp. 1829–1832, Sep. 2001.
- [256] R. Graeff and H. C. Lee, "A novel cycling assay for cellular cADP-ribose with nanomolar sensitivity," *Biochem. J.*, vol. **361**, no. Pt 2, pp. 379–384, Jan. 2002.
- [257] T. C. Südhof, "Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease," *Nature*, vol. **455**, no. 7215, pp. 903–911, Oct. 2008.
- [258] K. K. Ganguly, S. Pal, S. Moulik, and A. Chatterjee, "Integrins and metastasis," *Cell Adhes. Migr.*, vol. **7**, no. 3, pp. 251–261, Jun. 2013.
- [259] A. O. Sahin and M. Buitenhuis, "Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells," *Cell Adhes. Migr.*, vol. **6**, no. 1, pp. 39–48, Feb. 2012.
- [260] M. Stefanidakis and E. Koivunen, "Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression," *Blood*, vol. **108**, no. 5, pp. 1441–1450, Sep. 2006.
- [261] T. Vaisitti, S. Serra, C. Pepper, D. Rossi, L. Laurenti, G. Gaidano, F. Malavasi, and S. Deaglio, "CD38 signals upregulate expression and functions of matrix metalloproteinase-9 in chronic lymphocytic leukemia cells," *Leukemia*, vol. **27**, no. 5, pp. 1177–1181, Apr. 2013.

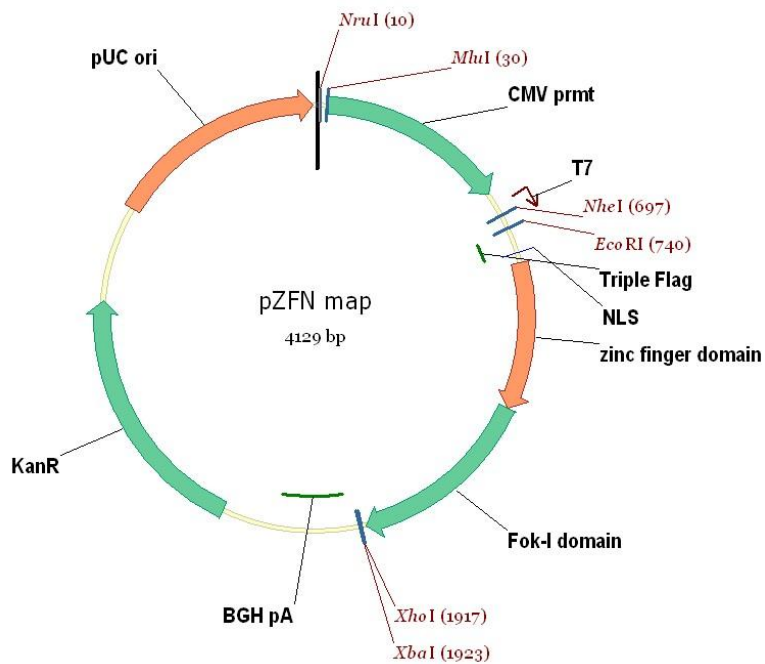
ANNEXES

1. Annexe 1 : Cartes des vecteurs plasmidiques.

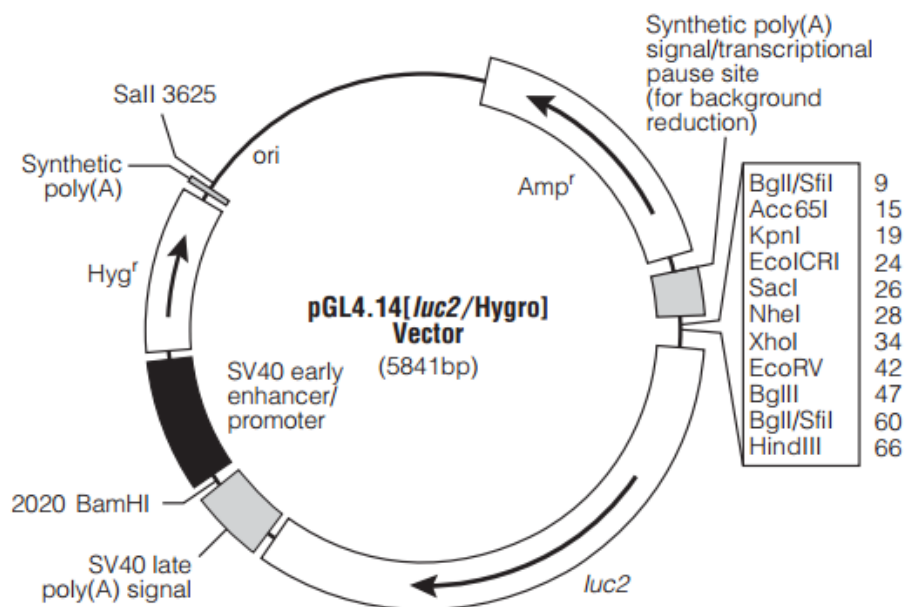
A. Vecteur pMEP4



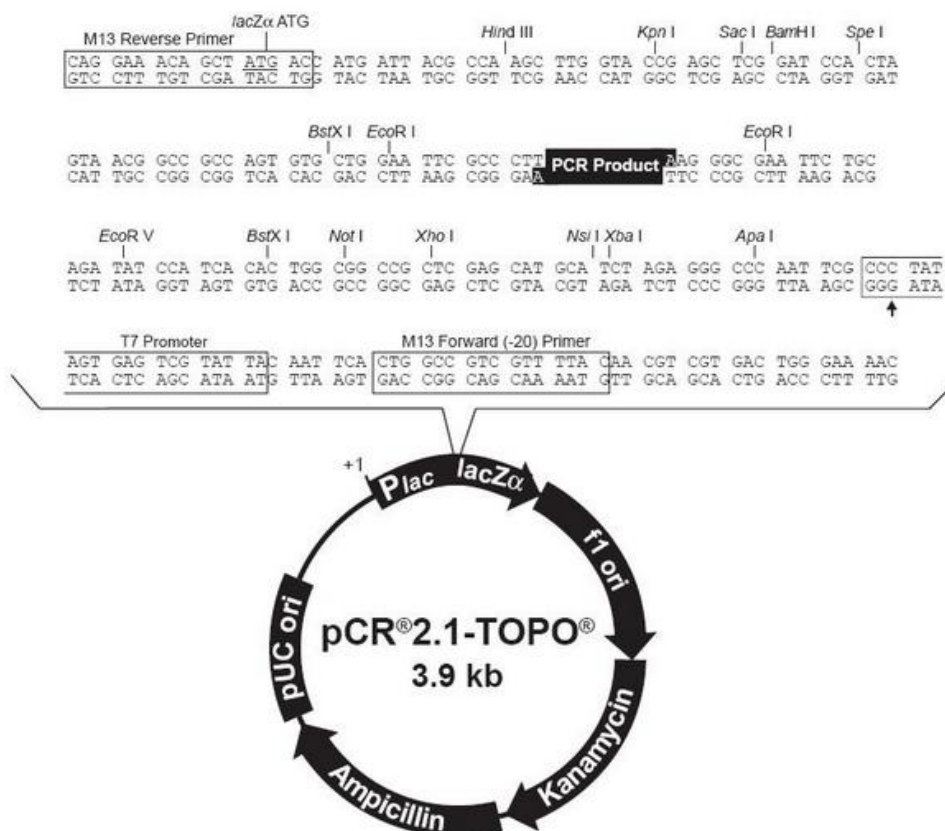
B. Vecteur pZFN



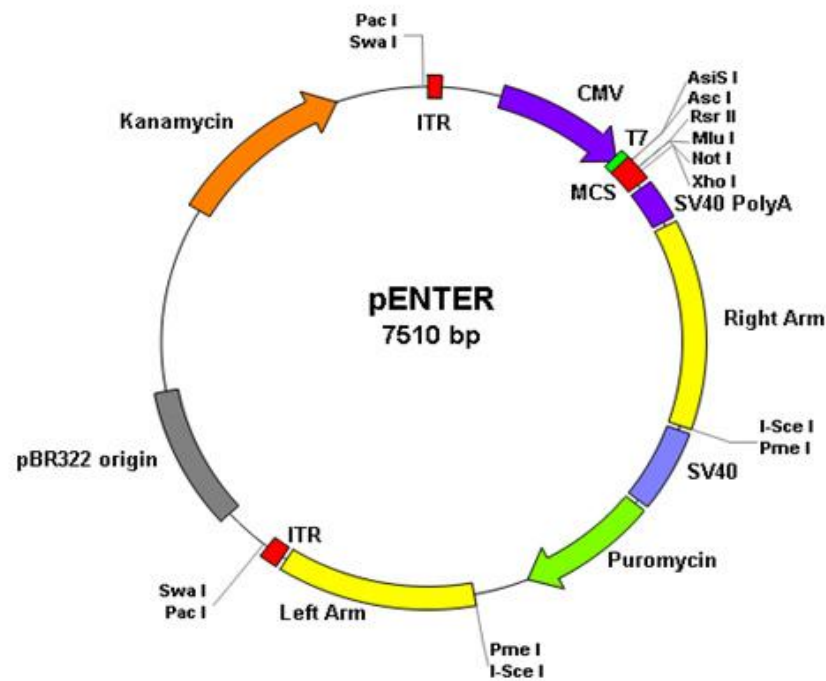
C. Vecteur *pGL4.14 [LUC2/Hygro]*



D. Vecteur *pCR2.1-TOPO*



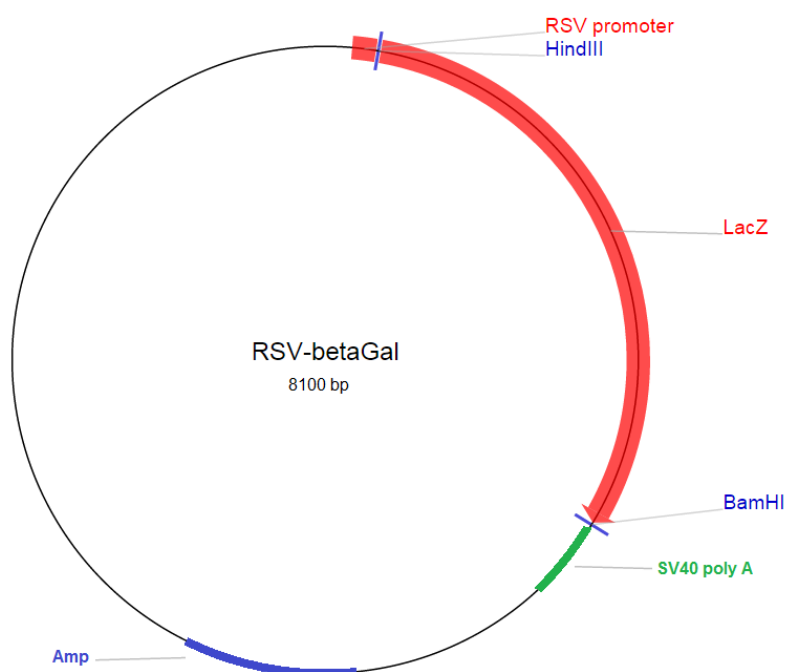
E. Vecteur pENTER



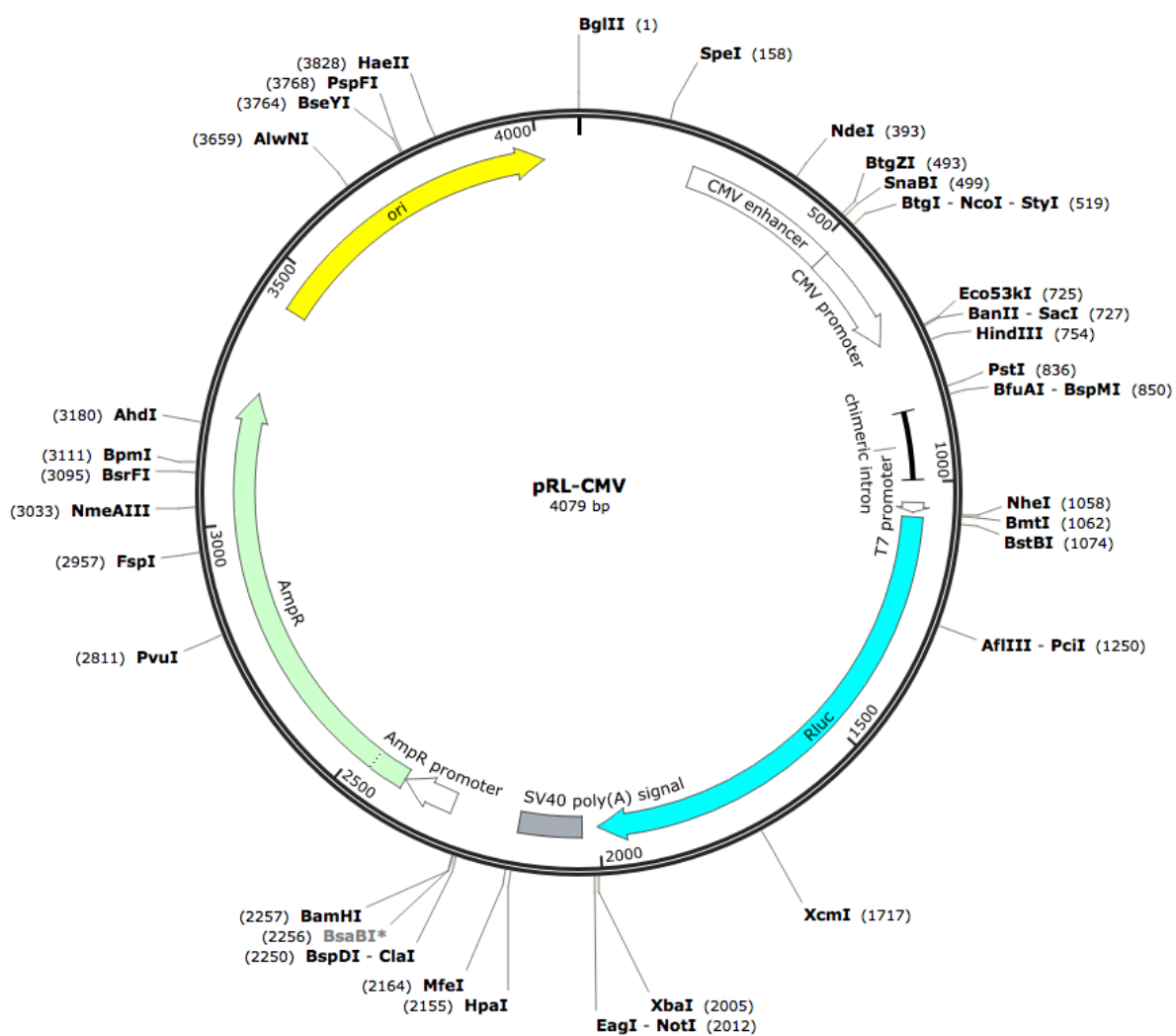
```
GGA TCC GGT ACC GAG GAG ATC TGC CGC CGC GAT CGC C ORF ACG CGT ACG CGG CCG CTC
CCT AGG CCA TGG CTC CTC TAG ACG GCG GCG CTA GCG G TGC GCA TGC GCC GGC GAG
      KpnI              AsiSI              MluI              NotI

GAG GAT TAT AAG GAT GAC GAC GAT AAA TTC GTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TAA
CTC CTA ATA TTC CTA CTG CTG CTA TTT AAG CAG CTC GTG GTG GTG GTG GTG GTG ATT
  E  D  Y  K  D  D  D  D  K  F  V  E  H  H  H  H  H  H  *
```

F. Vecteur pRSV-βGal



G. Vecteur pRL-CMV



2. Annexe 2 : Tableau récapitulatif des amorces de PCR utilisées.

qRT-PCR			
Amorce	Séquence	Température d'annealing	Taille produit
ABL-S	5'-TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGG-3'	59°C	120 pb
ABL-AS	5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3'		
SMAD1-S	5'-ACTGCCTCATGTCATTTACTGC-3'	60°C	133 pb
SMAD1-AS	5'-CTATTGGGAGAGTGAGGAAACG-3'		
CD38S-S	5'-GGGAGCTGAACAATGAACAC-3'	59°C	1362 pb
CD38M-S	5'-CATTAAAAAGTGGGCAAAGG-3'		1976 pb
CD38L-S	5'-GAACTGTCCATATCTAAGGTCTC-3'		3047 pb
CD38-AS	5'-GCTGGGCGAAGATGAGG-3'		
5RA-S	5'-TGGCCTAACTGGCCGGTACCACCCAGAGCTTAGCCACTGA-3'	64°C	1411 pb
5RA-AS	5'-GAGAGCCAAATCACGCTGGTCACATGCATTTTCAGG-3'		
3RA-S	5'-AATGCATGTGACCAGCGTGATTTGGCTCTCTGCTT-3'	64°C	1011 pb
3RA-AS	5'-TCTTGATATCCTCGAGAATGCACCCTTGAAAGCATC-3'		

Cloning »

Principe du *design* des amorces pour la réaction de fusion.

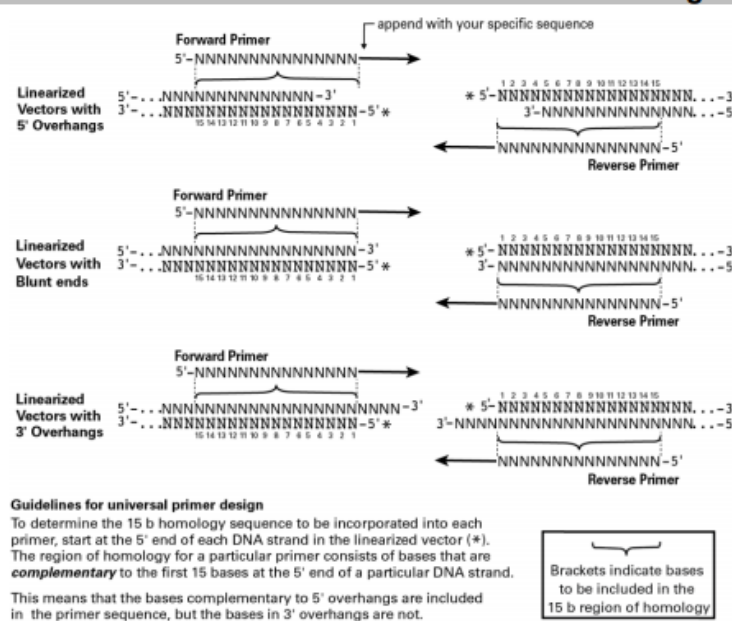


Figure 2. Universal primer design for the In-Fusion System. Successful insertion of a PCR fragment requires that the PCR insert share 15 bases of homology with the ends of the linearized vector. This sequence homology is added to the insert through the PCR primers. For vectors with sticky ends, bases complementary to 5' overhangs are included in the primer sequence; bases in the 3' overhangs are not.

4. Annexe 4 : Résultats du logiciel *TargetScan*

Cette capture d'écran montre une partie des résultats de la recherche de sites potentiels de liaison de miRs sur l'ARNm du gène *CD38*. Les prédictions pour les miR140-3-p et miR708 sont encadrées en rouge, ainsi que la colonne des probabilités de sites conservés de prédiction P_{CT} (*Probability of Conserved Targeting*)¹ et du score context+.

Conserved

No Conserved Found

Context+ score and features that contribute to the context+ score are evaluated as in Garcia et al., 2011.
Conserved branch lengths and P_{CT} are evaluated as in Friedman et al., 2008.

Poorly conserved

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context score	context+ score percentile	conserved branch length	P_{CT}
Position 9-15 of CD38 3' UTR hsa-miR-140-3p	5' ...NNNNNNNNGCGAGUGGUGUU... 3' ...GGACCAAGAUUGGACACCAU	7mer-m8	-0.120	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	too close to ORF	0.010	N/A
Position 20-26 of CD38 3' UTR hsa-miR-610	5' ...GUCGUGUGUUGUUUAGCUCC... 3' ...AGGGUCGUGUGUAAUUCGAGU	7mer-m8	-0.120	0.021	-0.023	-0.059	-0.022	0.009	-0.19	81	0.056	N/A
Position 21-27 of CD38 3' UTR hsa-miR-4633-3p	5' ...UCGUGUGUUGUUUAGCUCC... 3' ...ACGUUACGAGCGGACUAGGAGGA	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.052	-0.059	-0.009	-0.042	-0.28	94	0.056	N/A
Position 22-28 of CD38 3' UTR hsa-miR-3139	5' ...CGCUGUGUUGUUUAGCUCC... 3' ...UUGUCGUAGACACUUCGAGGAU	7mer-m8	-0.120	-0.007	-0.044	-0.059	-0.003	-0.049	-0.28	93	0.056	N/A
Position 22-28 of CD38 3' UTR hsa-miR-708	5' ...CGCUGUGUUGUUUAGCUCC... 3' ...GGGUCGAUCAAUUCGAGGAA	7mer-m8	-0.120	-0.007	-0.044	-0.059	-0.003	-0.049	-0.28	93	0.056	N/A
Position 22-28 of CD38 3' UTR hsa-miR-28-5p	5' ...CGCUGUGUUGUUUAGCUCC... 3' ...GAGUUAUCUGACACUUCGAGGA	7mer-m8	-0.120	0.012	-0.044	-0.059	-0.003	-0.049	-0.26	91	0.056	N/A
Position 34-40 of CD38 3' UTR hsa-miR-4457	5' ...UUUAGCUCCUUGACUCCUUGUG... 3' ...AUGCGGUCAGUUAUUGAACACU	7mer-m8	-0.120	0.012	-0.036	-0.057	0.006	-0.013	-0.21	87	0.056	N/A
Position 48-55 of CD38 3' UTR hsa-miR-1272	5' ...UCCUUGUGUUGUUUAGUCAUA... 3' ...AAAGUCUUAAGACGAGUAGUAG	8mer	-0.247	0.003	0.035	-0.102	-0.009	0.064	-0.26	95	0.010	N/A
Position 49-55 of CD38 3' UTR hsa-miR-1322	5' ...CCUUGUGUUGUUUAGUCAUA... 3' ...GUCGUAGUCGUGUAGUAG	7mer-1A	-0.074	0.008	0.016	-0.045	-0.016	0.033	-0.08	47	0.010	N/A
Position 61-67 of CD38 3' UTR hsa-miR-4663	5' ...UGUCAUACAUAGA--CUCAGCAU... 3' ...UGACGUGCAGGUACCGAGUGCA	7mer-1A	-0.074	-0.006	0.008	-0.043	0.011	-0.052	-0.16	71	0.731	N/A
Position 62-69 of CD38 3' UTR hsa-miR-4728-3p	5' ...GUCAUCAUACAUAGACUAGCAUA... 3' ...GACCCGUCUCCUCCUAGUCGUAC	8mer	-0.247	0.024	0.068	-0.099	-0.001	-0.011	-0.27	94	0.010	N/A
Position 70-76 of CD38 3' UTR hsa-miR-3619-5p	5' ...ACAUGACUAGCAUACUGUGG... 3' ...CGAGUGGUGCGGAGGACGACU	7mer-m8	-0.120	-0.025	-0.017	-0.052	0.031	-0.064	-0.25	92	0.010	0.104
Position 70-76 of CD38 3' UTR hsa-miR-761	5' ...ACAUGACUAGCAUA--CCUGUGG... 3' ...ACACAGUCAAGUGGAGGACGACG	7mer-m8	-0.120	-0.016	-0.017	-0.052	0.031	-0.064	-0.24	91	0.010	0.104
Position 70-76 of CD38 3' UTR hsa-miR-214	5' ...ACAUGACUAGCAUACUGUGG... 3' ...UGAGGACAGACACGAGGACGAC	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.017	-0.052	0.031	-0.064	-0.22	89	0.010	0.104
Position 71-77 of CD38 3' UTR hsa-miR-4530	5' ...CAUGACUAGCAUACUGUGG... 3' ...GCGAGGCGAG--GACGACCC	7mer-m8	-0.120	-0.016	0.021	-0.052	0.024	-0.064	-0.21	85	0.396	N/A


Bioinformatics and Research Computing
© 2006-2012 Whitehead Institute for Biomedical Research

TargetScan Release 6.2
Questions: wibr-bioinformatics@wi.mit.edu

Whitehead Institute for Biomedical Research
Compatibility

¹ Friedman et al., "Most Mammalian mRNAs Are Conserved Targets of microRNAs."

5. Annexe 5 : Résultats de la recherche de sites potentiels avec le logiciel TarBase

DIANA TOOLS


[HOME](#)
[SOFTWARE](#)
[PUBLICATIONS](#)
[CONTACT](#)

Software » TarBase v7.0

Username *

Password *

☐ Remember me next time

Login


[Forgot your password?](#)

- [Sign up for free!](#)
- or [take a tour](#)

Available features for **REGISTERED** users:

- [DOWNLOAD](#) databases
- History
- Bookmarks

LOGIN is not required to access the site!



NSRF - Management and Implementation Agency for RTD and Innovation Activities

Please cite:
I. S. Vlachos, M. D. Paraskevopoulou, D. Karagkouni, G. Georgakilas, T. Vergoulis, I. Kanellos, I.-L. Anastasopoulos, S. Maniou, K. Karathanou, D. Kalfakakou, A. Fevgas, T. Dalamagas and A. G. Hatzigeorgiou. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. Nucl. Acids Res. (2014)

Gene name	miRNA name	Methods	Pred.Score
CD38 (hsa) ⓘ	hsa-miR-335-5p ⓘ	MA ⓘ	-
CD38 (hsa) ⓘ	kshv-miR-K12-9 ⓘ	IP	-
CD38 (hsa) ⓘ	hsa-miR-140-3p ⓘ	RS ⓘ qP	-
CD38 (hsa) ⓘ	hsa-miR-3940-5p ⓘ	IP	-
CD38 (hsa) ⓘ	hsa-miR-17-5p ⓘ	IP	-
CD38 (hsa) ⓘ	hsa-miR-20a-5p ⓘ	IP	-
CD38 (hsa) ⓘ	hsa-miR-21-5p ⓘ	IP	-
CD38 (hsa) ⓘ	hsa-miR-101-3p ⓘ	IP	-
CD38 (hsa) ⓘ	hsa-miR-106b-5p ⓘ	IP	-
CD38 (hsa) ⓘ	ebv-miR-BART3 ⓘ	IP	-
CD38 (hsa) ⓘ	hsa-miR-92a-1-5p ⓘ	IP	-
CD38 (hsa) ⓘ	ebv-miR-BART1-3p ⓘ	IP	-

[Related Pathways](#)

Filters

- Species
- Method Type
 - ☐ Normal
 - ☒ High Throughput
- Method
- Regulation type
- Validation type
- Validated as
- Source

Publication year
1900

Only publications published after the selected year will be presented.

[Apply Filter!](#)

6. Annexe 6 : Certificats d'analyse des lignées cellulaires

HCL



Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille

Medical Genetic Institute
Conventional Cytogenetic in Hematology Departement

Jeanne de Flandre Hospital
Avenue Eugène Avinée, 59037 Lille Cedex
France

Tel: (33) 03 20 44 40 18
Fax: (33) 03 20 44 68 04

Dr C Roche-Lestienne, MCU-PH
Dr E Boudry-Labis, AHU

Cell Line Certification

Cell line : JOK-1

Cell Culture: Culture medium 80% RPMI 1640 + 20% FBS

Karyotype :

48, XY, del(1)(p32p36), der(4)t(1;4)(1pter→p32::4qter→pter), der(6)(6qter→p22::q12→qter),
+der(7)t(7;11)(7pter→q21::11p15→pter), der(8)t(5;8;12)(5pter→p14::12p11.2→p12::8q12→q
21::8?cen→q24.72), der(14)t(8;14)(8qter→q24?2::14q32.3→pter),
+der(8)t(8;?)(8q24→8p171::;?)

Initial Karyotype (according to DSMZ HG Drexler reference):

48, XY, +20, der(4)t(1;4)(1pter→p32::4qter→pter), der(6)(6qter→p22::q12→qter),
+der(7)t(7;11)(7pter→q21::11p15→pter), der(8)t(5;8;12)(5pter→p14::12p11.2→p12::8q12→q
21::8?cen→q24.72), der(14)t(8;14)(8qter→q24?2::14q32.3→pter),
+der(8)t(8;?)(8q24→8p171::;?)

Of note : inconsistencies between DSMZ reference and our result are underlined.

C. ROCHE-LESTIENNE
Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille
HÔPITAL JEANNE DE FLANDRE
Laboratoire de Génétique Médicale
59037 LILLE cedex
Tél. 03 20 44 40 18
Fax 03 20 44 68 04

Ce caryotype est conforme, validant l'origine de la lignée JOK-1. Notons la présence d'une (del(1)(p32p36)) et l'absence d'une duplication de chd'un chromosome 20 surnuméraire, témoignant d'une très légère dérive de la lignée cellulaire.



Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille

**Medical Genetic Institute
Conventional Cytogenetic in Hematology Departement**

Jeanne de Flandre Hospital
Avenue Eugène Avinée, 59037 Lille Cedex
France

Tel: (33) 03 20 44 40 18
Fax: (33) 03 20 44 68 04

Dr C Roche-Lestienne, MCU-PH
Dr E Boudry-Labis, AHU

Cell Line Certification

Cell line : ESKOL

Cell Culture: Culture medium 80% RPMI 1640 + 20% FBS

Karyotype :

46,XY,der(4)del(4)(p14),der(6)t(4;6)(p14;p21.3),del(7)(q32q36).

The result is expressed according to the ISCN 2015.

The initial Karyotype (according to DSMZ HG Drexler reference) is the same.

C. ROCHE-LESTIENNE
Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille
HÔPITAL JEANNE DE FLANDRE
Laboratoire de Génétique Médicale
59037 LILLE cedex
Tél. 03 20 44 40 18
Fax 03 20 44 68 04

Le caryotype de la lignée cellulaire Eskol utilisée dans ce travail est identique à celui de la lignée originelle.



Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille

**Medical Genetic Institute
Conventional Cytogenetic in Hematology Departement**

Jeanne de Flandre Hospital
Avenue Eugène Avinée, 59037 Lille Cedex
France

Tel: (33) 03 20 44 40 18
Fax: (33) 03 20 44 68 04

Dr C Roche-Lestienne, MCU-PH
Dr E Boudry-Labis, AHU

Cell Line Certification

Cell line : Hair-M

Cell Culture: Culture medium 80% RPMI 1640 + 20% FBS

Karyotype :

90, <4n>, XXX, -Y, +2, [0-1]-13x2, -14x2, der(17)t(8;17)(q21;q24)x2, der(18)t(16;18)(q11;p11),
der(19)t(Y;19)(q11;p or q11), [0-1]+20, +21, +mar1, +mar2.

The result is expressed according to the ISCN 2015.

Of note: Initial karyotype (according to DSMZ HG Drexler reference) mentioned a
del(3)(p174) and a t(15;17)(q26;p?q?) and other numerical inconsistencies not revealed by our
analysis.


C. ROCHE-LESTIENNE
Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille
HÔPITAL JEANNE DE FLANDRE
Laboratoire de Génétique Médicale
59037 LILLE cedex
Tél. 03 20 44 40 18
Fax 03 20 44 68 04

Cette lignée cellulaire possède de nombreuses anomalies communes avec la lignée cellulaire Hair-M originelle. Cependant, la présence de différences avec le caryotype de référence laisse penser à une dérive sous-clonale de cette lignée.



Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille

**Medical Genetic Institute
Conventional Cytogenetic in Hematology Departement**

Jeanne de Flandre Hospital
Avenue Eugène Avinée, 59037 Lille Cedex
France

Tel: (33) 03 20 44 40 18
Fax: (33) 03 20 44 68 04

Dr C Roche-Lestienne, MCU-PH
Dr E Boudry-Labis, AHU

Cell Line Certification

Cell line : EH/K

Cell Culture: Culture medium 80% RPMI 1640 + 20% FBS

Karyotype :

46,XY,add(6)(p25),del(14)(q21),add(15)(q25),der(20)t(1;20)(q13;q11).

The result is expressed according to the ISCN 2015.

C. ROCHE-LESTIENNE
Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille
HÔPITAL JEANNE DE FLANDRE
Laboratoire de Génétique Médicale
59037 LILLE cedex
Tél. 03 20 44 40 18
Fax 03 20 44 68 04

Cette lignée cellulaire possède l'anomalie del(14)(q21) caractéristique commune avec la lignée EH/K. La présence d'autres anomalies témoigne d'une dérivation sous-clonale.



**LABORATOIRE DE BIOCHIMIE, BIOLOGIE MOLECULAIRE,
HORMONOLOGIE, METABOLISME – NUTRITION, ONCOLOGIE**

Centre de Biologie et Pathologie – CHRU – CS 70001 - 59037 LILLE Cedex
Tél. secrétariat : 03 20 44 61 54 – Fax : 03 20 44 56 93 – Standard CHR : 03 20 44 59 62

Pr. Nicole Porchet

Oncologie et Génétique Moléculaires

Autorisation de pratiquer les examens des caractéristiques génétiques à des fins médicales renouvelée par arrêté préfectoral du 17 février 2012

Dr Marie-Pierre Buisine
Dr Clotilde Descarpentries
Dr Fabienne Escande
Dr Julie Leclerc
Dr Farid Zerimech

Poste : 36779
marie-pierre.buisine@chru-lille.fr

Lille, le 04 mai 2015

Mme Staëlle CHAMAILLARD
Centre de Recherches JP Aubert
INSERM UMR 1172
Rue M. Polonovski
59045 LILLE Cedex

CELL LINE AUTHENTICATION REPORT

REFERENCES: G15.04

Supplied reference: -

SAMPLES:

TYPE: human cell lines; cell pellets

PROVIDER: S. CHAMAILLARD, JPARC, INSERM UMR 1172, LILLE

DATE OF REQUEST: 20/04/2015

DATE OF RECEIPT: 20/04/2015

RESULTS AND INTERPRETATION:

Name	Identification*	EV (score)	Conclusion**
HC-1	HC-1 / 301	0.95 (36/38)	HC-1 / 301

* corresponds to the cell line with the best % match (Evaluation Value (EV) score)

** no match: indicates that the cell line profile does not match with an available reference Profile (EV < 0.80)

The detailed results are provided in Annex.

METHODS USED:

DNA extraction: Prepito DNA Cyto Pure kit with chemagic Prepito-D (PerkinElmer)

DNA profiling system: kit PowerPlex 18D, Promega

Data analysis: DSMZ Online STR Analysis (DNA typing using a 9-loci profile (8 STR and Amelogenin) and authentication by screening reference databases from DSMZ, ATCC, JCRN, and RIKEN)

M. CREPIN (Chief Engineer)

M.-P. BUISINE

Le score d'évaluation pour la lignée cellulaire HC-1 est proche de 1 et démontre l'affiliation de la lignée cellulaire étudiée à la lignée HC-1.

7. Annexe 7 : Principe de la technique utilisant les ZFNs

Nous avons utilisé la technique des ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*) grâce au procédé *CompoZR Knockout Zinc Finger Nucleases*[®], commercialisé par la société Sigma-Aldrich[®], et comprenant 2 plasmides codant chacun pour une nucléase. Les ZFNs sont des protéines chimériques se liant à l'ADN et possédant 2 domaines fonctionnels. Le premier est le domaine de liaison à l'ADN (en Nt), composé de 4 à 7 domaines à doigts de zinc, reconnaissant une séquence de 12 à 21 paires de bases permettant de cibler spécifiquement un gène donné. Dans le cas du KO du gène *CD38*, ces séquences sont de 18 et 20 nucléotides et ciblent le début de l'exon 1 (cf. **Annexe 8**). L'utilisation de ces 2 longues séquences pour la liaison du ZFN, reconnaissant précisément la séquence de *CD38*, constitue un premier moyen d'accroître la spécificité d'action du ZFN. Le second domaine fonctionnel est la nucléase *FokI* qui va induire la coupure de l'ADN. Cette nucléase a pour particularité de fonctionner en homodimère pour pouvoir induire une cassure « double brin », les deux coupures encadrant une séquence de 5 nucléotides. Cette homodimérisation est un second moyen d'assurer la spécificité du clivage, car dans le cas d'une hybridation aspécifique du ZFN, il est quasiment impossible d'avoir une fixation d'un deuxième ZFN sur le brin d'ADN complémentaire et suffisamment proche pour permettre cette dimérisation.

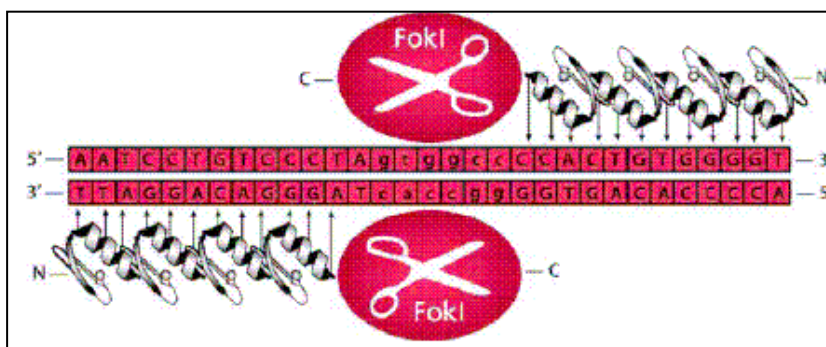


Schéma de la structure et du fonctionnement d'une ZFN. Source : document technique de Sigma-Aldrich[®]

La cassure double brin induite par l'action conjointe des 2 domaines *FokI* est alors suivie de l'action des systèmes de réparation de l'ADN. Si le mécanisme de recombinaison homologue a lieu, le gène retrouve sa séquence originelle. Si le mécanisme non conservatif NHEJ (pour *Non Homologous End Joining*) réalise la réparation, il peut y avoir ligature des extrémités clivées associée à la délétion ou à l'insertion de nucléotides afin de rétablir la complémentarité des 2 brins. Ce mécanisme NHEJ induit des mutations dans la séquence du gène et a statistiquement 2 chances sur 3 d'induire un décalage du cadre de lecture ouvert du

gène (*frameshift*). C'est cet évènement que l'on souhaite sélectionner dans la méthode de KO induite par les ZFNs. En effet, ce décalage du cadre de lecture induit l'introduction de codons STOP précoces dans la séquence de l'ARNm produit, aboutissant dans la majorité des cas à un ARNm instable totalement différent de celui produisant la protéine d'intérêt. Cette protéine ne peut donc plus être produite si la rupture de la structure du gène se produit de manière homozygote.

8. Annexe 8 : Site de liaison des ZFNs sur le gène *CD38*.

En majuscule : site de liaison. En rouge : séquence encadrée par les deux coupures des nucléases. La séquence donnée correspond au brin sens de l'AD N.

5'-CTTTCCCGAGACCGTCCT**ggcgc**GATGCGTCAAGTACACTGAA-3'

9. Annexe 9 : Tableau récapitulatif des séquences *OFF-targets* potentielles des ZFNs ciblant CD38

avec leur localisation dans le génome humain, le nombre de d'erreurs (*mismatches*) comparés à la séquence cible et les amorces utilisées pour réaliser le séquençage.

Nom de la séquence	Localisation dans le genome humain	Nombre de <i>mismatches</i> comparé à la séquence cible des ZFN CD38	Amorces
CD38	4p15.32	0	F : 5' -CAACTCTGTCTTGGCGTCAG-3'
			R : 5' -GGACTCCCTACTCAGCACCA-3'
OFF target n°1	1q23.3	8	F : 5' -CAAAAGAGTGATGGGGTAGG-3'
			R : 5' -TATTTATAGGCAAGGTGAGGAC-3'
OFF target n°2	5p14.3	9	F : 5' -CTGGGGAAACCTAAGAGATG-3'
			R : 5' -GGCTCATGGAAGAAAATAAG-3'
OFF target n°3	7q34	9	F : 5' -TCTGCTGGGAGTAGGATGC-3'
			R : 5' -TGCTAACAATGCTGGGTCA-3'
OFF target n°4	9p21.1	9	F : 5' -TATGTACTGCCAGGTCAAG-3'
			R : 5' -TTTTTCTTTCTCAGCTGCC-3'

10. Annexe 10 : Liste des gènes différemment exprimés entre les lignées JOK-E et JOK-R.

Les ratios représentent les taux d'expression du gène concerné dans la lignée JOK-R divisés par ceux de la lignée JOK-E. Certains gènes présentent plusieurs valeurs car leur expression a été mesurée par plusieurs sondes. Les 2 colonnes de gauche présentent les gènes surexprimés dans la lignée JOK-R et les 2 colonnes de droite ceux sous-exprimés dans la lignée JOK-R.

Dénomination du gène	Ratio JOK-R/JOK-E	Dénomination du gène	Ratio JOK-R/JOK-E
SMAD1	6.2886553	CTSS	0.66462076
GAS7	5.4389305	TATDN1	0.6568613
RAMP1	4.728483	MREG	0.65228397
BMP7	4.292202	LANCL1	0.6486184
GPR109B	3.9487977	ZNF572	0.64356923
ACTG1	3.9455783	KCNMA1	0.6402621
PLEKHA5	3.7931092	LMAN1	0.6395518
PRAME	3.791724	DOCK10	0.63875073
ACTG1	3.7462702	HHAT	0.6367652
LGALS2	3.627387	UBE1L	0.6358007
MYBPH	3.573318	TSPAN33	0.63402975
CSTA	3.568915	MEIS1	0.625441
ACTG1	3.500567	IFI35	0.6251586
CX3CR1	3.4639919	PMAIP1	0.62396437
FBLN5	3.2154136	TAF2	0.6160541
WASF3	2.9556143	TREML2	0.6120781
ABCA1	2.942475	APOL3	0.6031951
PSTPIP1	2.9219525	INPP4B	0.60286474
RPS6KA2	2.8897645	TRIM5	0.5991679
GDF15	2.6987205	TRIM34	0.59796
LPIN2	2.6276016	MTBP	0.59636766
FAM129C	2.5624382	SQLE	0.5954149

RGS9	2.4957542	GPNMB	0.59245485
WNT5A	2.4599917	NSMCE2	0.5889976
FAM129C	2.4171073	GCA	0.54916614
PBX4	2.3453975	FHOD3	0.54912764
CCL3	2.3449273	LCK	0.5475555
TRAM2	2.220027	SLC45A3	0.54654783
CCL4	2.2094526	EVL	0.54351556
PIF1	2.1539943	MRPL13	0.53950524
FSD1	2.124695	RAD21	0.53895533
FCN1	2.1189315	RABGAP1L	0.5379007
HRK	2.1032066	BRDG1; STAP1	0.53413504
CCL3L3	2.079029	PTPN22	0.5319746
DNMT3B	2.06634	FCER2	0.5305727
IGF1R	2.0227623	TXNDC10	0.5300875
AEBP2	2.0172904	RNF139	0.53001595
HES6	2.0086114	CUTL2	0.52602375
AICDA	2.0012462	RABGAP1L	0.5237811
TMEM121	1.989473	KATNAL2	0.5224727
CEBPB	1.9755872	RTP4	0.52126706
SYT17	1.9377832	SIGLECP3	0.51979566
SOX4	1.9327519	FCRL3	0.5186929
C1orf38	1.9264448	HRASLS2	0.5170519
IL3RA	1.9204162	MET	0.51675856
PSD3	1.8746969	GRN	0.516748
ANKRD25	1.8722095	HRASLS2	0.5136126
CLCN2	1.8705933	GLI1	0.5071289
PSD3	1.8701982	ATAD2	0.50656885
RALBP1	1.85181	KIAA0196	0.50094813
SOX4	1.8141304	MAT1A	0.49987984

CCL5	1.8128628	BCL2A1	0.49457207
DLGAP4	1.8041066	RABGAP1L	0.49155042
PTPRE	1.8036617	LYSMD2	0.48030168
PTPRE	1.8011603	RFTN1	0.48002797
SLC26A11	1.7922691	BACE2	0.4781624
FGF18	1.7829062	SPARCL1	0.4773112
LPP	1.7761987	ITGB7	0.4766924
SCAMP5	1.7731211	SLCO2B1	0.47625569
AEBP2	1.7673837	FAM59A	0.47582334
GRIN2C	1.7532465	ZHX1	0.47579625
NMU	1.7511133	GPR30	0.46982944
DEFB123	1.7477841	BACE2	0.4697338
IL7R	1.738165	CASP1	0.4685269
PRNP	1.7139717	WDR67	0.46541324
NAPG	1.7125725	RABGAP1L	0.46477848
HM13	1.6965039	UBE2E3	0.45598066
EMP3	1.6928232	SERPINB8	0.44595307
SMARCD3	1.6876858	SERPINB8	0.44085145
TXNDC13	1.6635917	IL1R2	0.43468657
HSPA4	1.6201519	DERL1	0.4319562
TBXAS1	1.6170626	TXNDC10	0.43064097
METRNL	1.610876	C21orf34	0.42581716
SETBP1	1.5830135	BCAS3	0.42480385
POLS	1.5756407	IGHV1-69	0.42335907
RBM38	1.5647299	IL1R2	0.4224477
STAU2	1.5643996	BCAS3	0.41555017
SH3BP5	1.5613918	FAM59A	0.41279885
PRKCA	1.5594162	CASP5	0.41102535
BMF	1.5586584	CARD6	0.41006714

PYGB	1.5285668	CASP4	0.40607908
POLK	1.5089407	CASP4	0.40369293
DSTN	1.5085346	GBP1	0.39652443
KRAS	1.5069479	C21orf34	0.3921393
C20orf67	1.5005012	<u>ITGAX</u>	0.38987002
		TNFRSF17	0.37698367
		TEKT5	0.374265
		ACTG2	0.3729196
		KYNU	0.36451
		TNNI3	0.36173925
		ATP10D	0.34673265
		MARCH1	0.34283775
		C19orf51	0.34179458
		CSF1R	0.34053615
		KYNU	0.3345878
		CEACAM1	0.3324242
		BCHE	0.33158958
		IGJ	0.32958195
		SAMSN1	0.31948394
		UBE2E3	0.31575114
		C1orf54	0.27824864
		PPP1R9A	0.2717641
		NRXN3	0.25116503
		FCRL2	0.20792212
		BANK1	0.19156346
		CD38	0.14549375
		C11orf41	0.123147525

Ces expériences ont été mises en place par le Docteur Sylvie Galiègue-Zouitina et réalisées par la plateforme de génomique fonctionnelle de l'IMPRT, en 2007. En 2009, les résultats ont été réanalysés par Martin Figeac à l'aide d'une version mise à jour du logiciel d'analyse ².

² Delestré et al., "Repression of the RHOH Gene by JunD."

CD38 in Hairy Cell Leukemia is a Marker of Poor Prognosis and a New Target for Therapy

Nicolas Poret¹, Qiangwei Fu², Soizic Guihard¹, Meyling Cheok¹, Katie Miller³, Gordon Zeng⁴, Bruno Quesnel¹, Xavier Troussard⁵, Sylvie Galiègue-Zouitina¹ and Carl Simon Shelley²

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S1172, Centre Jean-Pierre Aubert, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille and Université de Lille, Lille, France

² Kabara Cancer Research Institute, Gundersen Medical Foundation, La Crosse, Wisconsin, USA

³ Department of Biology, Saint Mary's University of Minnesota, Winona, Minnesota, USA

⁴ Department of Pathology, Gundersen Health System, La Crosse, Wisconsin, USA

⁵ Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Caen, France

Correspondence:

Dr. C. S. Shelley, Kabara Cancer Research Institute, 1300 Badger Street, La Crosse, WI 54601, USA. Telephone: (001) (617) 997-5097. Fax: (001) (608) 775-6602.

Email: simonshelley@ymail.com

Dr. S. Galiègue-Zouitina, UMR-S1172 INSERM, IRCL. Place de Verdun, 59045, Lille Cedex, France. Telephone: (33) 3 20 16 92 17. Fax: (33) 3 20 16 92 29.

Email: sylvie.zouitina@inserm.fr

Running Title: Targeting CD38 to treat HCL.

Research Support: Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille, Comité du Nord and Comité du Pas de Calais of Ligue Nationale Française Contre le Cancer and Université de Lille, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), SIRIC OncoLille grant INCa-DGOS-INSERM 6041aa. Sanofi Oncology, the Kabara Cancer Research Institute and the Hairy Cell Leukemia Research Foundation supported testing of SAR650984.

Keywords: HCL; RhoH; CD38; knockout; apoptosis, adhesion; xenograft mouse model; SAR650984.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no competing financial interests in relation to the work described.

Word Count: 3992

Total number of Figures: 7

Abstract

Hairy cell leukemia (HCL) is characterized by under-expression of the intracellular signaling molecule RhoH. Reconstitution of RhoH expression limits HCL pathogenesis in a mouse model indicating this could represent a new therapeutic strategy. However, while RhoH reconstitution is theoretically possible as a therapy, it is technically immensely challenging as RhoH protein that is appropriately functional needs to be specifically targeted. Because of this problem, we sought to identify *druggable* proteins on the HCL surface that were dependent upon RhoH under-expression. One such protein was identified as CD38. Analysis of 51 HCL patients, demonstrated that 18 were CD38-positive. Interrogation of the clinical record of 23 relapsed HCL patients demonstrated those that were CD38-positive had a mean time to salvage therapy 71 months shorter than patients who were CD38-negative. Knockout of the CD38 gene in HCL cells increased apoptosis, inhibited adherence to endothelial monolayers and compromised ability to produce tumors *in vivo*. Furthermore, an anti-CD38 antibody proved effective against pre-existing HCL tumors. Taken together, our data indicate that CD38 expression in HCL drives poor prognosis by promoting survival and heterotypic adhesion. Our data also indicate that CD38-positive HCL patients might benefit from treatments based on CD38 targeting.

Introduction

Hairy-cell leukemia (HCL) is an indolent lymphoproliferative disease characterized by pancytopenia, hepatomegaly, splenomegaly, leukocytosis and neoplastic mononuclear cells in the peripheral blood, bone marrow, liver and spleen (1). Complete remission rates approaching 95% can be achieved by front-line treatment with the purine nucleoside analogues pentostatin or cladribine and second-line treatments that include rituximab or vemurafenib (2, 3). However, despite these impressive statistics, a significant proportion of HCL patients either fail to respond to therapy or develop resistant disease (3). In addition, approximately 48% of patients relapse within 15 years and as time progresses the incidence of relapse increases (4). Since HCL usually presents in late middle-age, countries with aging populations can expect an increasing need for new treatments.

One of the diagnostic markers of HCL is abnormal expression of the gene encoding CD11c (5). Normally, this gene is transcribed only in cells of the myeloid lineage (6). However, in HCL it is also transcribed in the neoplastic lymphocytes. This aberrant transcription is driven by constitutive binding of the proto-oncogene JunD to the CD11c gene promoter (7). Tracking back along a cascade of molecular events, we demonstrated that this activation of JunD is caused by constitutive signaling through the intracellular Ras pathway (7).

Signaling by members of the Ras super-family has been shown to be inhibited by high quantitative levels of RhoH (8). We have found that HCL is characterized by chronic under-expression of RhoH (9). Consequently, the low level of RhoH found in HCL likely allows members of Ras family to be active and drive disease pathogenesis. *In vitro* reconstitution of RhoH expression inhibits the aberrant expression of CD11c as well as the adhesion and

trans-endothelial migration that are hallmarks of HCL (9). In a xenograft mouse model, RhoH reconstitution severely limits HCL pathogenesis and protects against mortality (9).

Our pre-clinical studies indicate that RhoH reconstitution could be a new therapy for HCL. However, the transition of this therapy from the laboratory bench to the hospital bedside is technically extremely difficult. First, it requires a recombinant protein to be introduced inside hairy cells. Second, it requires this protein to be specifically targeted only to hairy cells. Third, it requires the protein to be functionally and appropriately active when inside the cells. Because of these challenges, a protein was sought that was dependent upon RhoH under-expression but produced on the cell surface and so easily targeted.

In order to identify a cell-surface protein dependent upon RhoH under-expression, we utilized differential microarray analysis to compare the transcriptome of HCL reconstituted with RhoH with the transcriptome of non-reconstituted HCL. This analysis indicated that the mRNA encoding the cell-surface protein CD38 was dependent upon RhoH under-expression. Subsequently this dependence was confirmed at the protein level. These findings led us to the hypothesis that CD38 could be involved in the pathogenesis of HCL and its targeting might be therapeutic. In order to test this hypothesis we performed functional analyses on HCL where the CD38 gene had been knocked out. These studies indicated that CD38 promotes HCL survival, heterotypic adhesion and the growth of xenografts in mice. That CD38 contributes to HCL pathogenesis was further demonstrated by the finding that CD38-positive patients relapsed dramatically sooner than patients who were CD38-negative. Analysis of 51 HCL patients by flow cytometry or immunohistochemistry demonstrated 18 were CD38-positive. Testing of the humanized anti-CD38 antibody SAR650984 in a mouse model indicates that this approximate one-third of HCL patients could benefit from the development of anti-CD38 treatments.

Methods

Patient material

Immunohistochemical analysis was performed on formalin-fixed paraffin-embedded bone marrow biopsies collected from patients diagnosed with either classical HCL or chronic lymphocytic leukemia (CLL) at the Gundersen Medical Center, La Crosse, Wisconsin (10, 11). The prognostic ability of CD38 was determined by examining the clinical records of 43 patients diagnosed with classical HCL at the Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Caen, France. Nine of these patients scored 3 points and 34 patients scored 4 points on the Royal Marsden scoring system for HCL (12). Cases where multi-parameter flow cytometry showed that 30% or more of HCL cells exhibited CD38 expression were designated as being CD38-positive. First-line and salvage treatments were initiated when patients had platelet counts under $100 \times 10^9/\text{L}$, hemoglobin levels under 10 g/dL or absolute neutrophil count under $1 \times 10^9/\text{L}$.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded blocks containing bone marrow biopsy specimens were serially sectioned at $4\mu\text{m}$ and dried overnight on *Colorfrost® Plus* microscope slides (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA). Next, sample slides were deparaffinized and one slide from each block was stained with Hematoxylin and Eosin Y. The remaining slides were subjected to epitope retrieval using Epitope Retrieval Solution, pH 9 (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA). Next, the slides were rocked with the Peroxidase Blocking reagent of the EnVision+ System-HRP (DAB) (Dako North America, Inc.) and then with Surfact-Amps® X-100 (Thermo Fisher Scientific, Inc.). One slide from each block was rocked with an IgG non-immune rabbit antibody (Epitomics, Inc., Burlingame, CA). One slide from each block

was identically incubated with the rabbit monoclonal EPR4106 antibody that recognizes human CD38 (Abcam, Inc., Cambridge, MA). Serial rocking incubations were next performed with Labeled Polymer-HRP Anti-Rabbit, Wash Buffer and DAB+ Chromogen (Dako North America, Inc.). Finally, slides were counterstained with Hematoxylin and the tissue protected by glass coverslips mounted with Permount® (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Cell culture

The hairy-cell line HC-1 was obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Braunschweig, Germany). The hairy-cell line EH was provided by Guy B. Faguet (Veterans Administration Medical Center, Augusta, GA). Subsequently the real identity of EH was found to be the hairy cell line HK (13). Therefore, herein we refer to this line as EH/K. The hairy-cell line ESKOL was provided by Edward F. Srour (Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN). The hairy-cell lines JOK-1, and Hair-M were provided by Jørn Koch (Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark). Human microvascular endothelial cells (HMEC-1) were provided by Laurent Plawinski (CNRS UMS 3408 Université de Caen, France). The HCL cell lines JOK-Empty and JOK-RhoH were obtained as previously described and grown in RPMI-1640 containing 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 150 µg/ml hygromycin B (Gibco Life Technologies, Corp., Saint-Aubin, France) (9). All other HCL cell lines were grown in this same medium lacking hygromycin B. HMEC-1 was grown in Medium 131 containing 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and Microvascular Growth Supplement (MVGS) (Gibco Life Technologies, Corp.). In addition, surfaces on which HMEC-1 were grown were coated with Attachment Factor (AF) (Gibco Life Technologies, Corp.). Activation of HMEC-1 was achieved using 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, Corp., Saint-Quentin Fallavier, France).

Generation of stable cell line pools

The plasmid pGL4.51[Luc2/CMV/Neo] contains the luciferase gene of *Photinus pyralis* under control of the constitutive gene promoter of cytomegalovirus (Promega, Corp., Madison, WI, USA). This plasmid was linearized with the restriction endonuclease *Sa*I and transfected into the HCL cell line JOK-1. The cell line pool JOK-Luc was subsequently selected by resistance to 1 mg/ml G418 (Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, MO, USA). Knockout of the CD38 gene was engineered in the HCL cell line JOK-1 using a CompoZR Zinc Finger Nuclease (ZFN) kit (CKOZFND5725, Sigma-Aldrich, Corp.). Parental JOK-1 cells were transfected with each of the two ZFN plasmids in the kit and CD38-negative cells isolated by a BD FACSAria™ I cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) using a FITC-labeled mouse anti-human CD38 antibody and an isotype-matched non-immune FITC-labeled antibody (clones IB6 and IS6-11E5.11, respectively) (Miltenyi Biotec, Paris, France). CD38-negative cells were isolated as single clones in 96 multi-well culture plates using the auto-cloning module of the cell sorter. In the same way CD38-positive clones were isolated from the bulk of transfected parental JOK-1 cells. Next, the CD38 gene in each isolated clone was sequenced through the ZFN-targeted region (Supplementary information, Figure S1). Six clones were identified that contained homozygous frame-shift mutations within the CD38 coding region (Supplementary information, Figure S2). Six clones were identified that contained no mutations within this same region. All validated clones were first cultured alone and then 10⁶ cells of each were mixed together to produce the cell line pools JOK-CD38-WT and JOK-CD38-KO representing HCL where the CD38 gene is wild-type or mutated, respectively. Expression of CD38 in each of these pools was assessed by western blotting and flow cytometry (Supplementary information, Figure S3 and S4, respectively).

Microarray analysis

The transcriptomes of JOK-RhoH and JOK-Empty were compared as previously described using Human Whole Genome Agilent 44K 60-mer oligonucleotide microarrays and an Agilent DNA Microarray G2505B scanner (Agilent Technologies, Les Ulis, France) (14). Expression data was extracted by Feature Extraction Version 9.1.3.1 then analyzed by GeneSpring Version 7.3 (Agilent Technologies).

Quantitative RT-PCR

Total RNA from cell cultures was purified then reverse-transcribed into cDNA using Moloney murine lentivirus reverse transcriptase and random primers (Invitrogen, Life Technologies, Corp.).^{13,18} Next, 100 ng of the generated cDNA was subjected to quantitative PCR using the Taqman Universal Master Mix and the CD38 Gene Expression Assay Hs01120068_m1 containing a CD38-specific TaqMan probe and primers (Applied Biosystems, Life Technologies, Corp.). Linear regression curves constructed using serial dilutions of cDNA generated from the CD38-positive cell line HC-1 quantified CD38 expression levels which were then normalized against expression of ABL mRNA (9, 14). PCR was performed on an 7900HT Real-Time PCR System using the standard protocol of SDS 2.4 software (Applied Biosystems, Life Technologies, Corp.).

Western blotting

Proteins were isolated from cell cultures using the M-PER® lysis reagent (Thermo-Fisher Scientific, Perbio Science, Brebières, France). Proteins were then reduced using Sample Reducing Agent (Life Technologies, Corp.), subjected to polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose filters. Next, filters were incubated with primary antibodies directed against human CD38, β -actin or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Specifically, the anti-CD38 antibody used was mouse monoclonal 22/CD38 (BD

Pharmingen, Le Pont-de-Claix, France). Anti- β -actin was mouse monoclonal AC-15 (Sigma-Aldrich, Corp). Anti-GAPDH was rabbit polyclonal FL-335 (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Following incubation with primary antibodies, filters were washed and incubated with appropriate anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Cell Signaling Technology, Inc., Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Filters were again washed and HRP visualized using the Amersham ECL Prime® Western Blotting System (GE Healthcare Europe, GmbH, Vélizy-Villacoublay, France).

Flow cytometry

Flow cytometric analysis of JOK-Empty, JOK-RhoH, JOK-CD38-WT and JOK-CD38-KO was performed by incubating 5×10^5 cells with a FITC-conjugated version of the monoclonal antibody IB6 directed against CD38 (Miltenyi Biotec). The isotype-matched control for these experiments utilized a FITC-conjugated version of the IgG2b clone IS6-11E5.11 (Miltenyi Biotec). Following incubation with antibodies, cells were analyzed using a CyAn™ ADP flow cytometer equipped with Summit software 4.3 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA).

Cell-cycle assays

The percentage of cells in the S phase of the cell cycle was assessed using the Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 Flow Cytometry Assay Kit (Life Technologies, Corp.). The assay consisted of labeling 5×10^5 cells with 10 μ M of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), fixation with Click-iT® fixative then permeabilization with Click-iT® saponin based reagent. Next, intracellular EdU was conjugated with Alexa Fluor® 647 using the Click-iT® reaction cocktail. The percentage of cells that were positive for EdU-Alexa Fluor® 647 was determined by flow cytometry and taken as representing the proportion of the culture in S phase.

Apoptosis assays

Cultures of JOK-CD38-WT or JOK-CD38-KO were initiated. After 72 hours 5×10^5 cells were washed in ice-cold phosphate buffered saline (PBS) then incubated with FITC-conjugated Annexin V and propidium iodide (PI) (Beckman Coulter, Inc., Villepinte, France). The percentage of PI-positive cells that were also Annexin V-positive was determined by flow cytometry and taken as the proportion of the cultures that were undergoing apoptosis.

Heterotypic adhesion assays

The ability of JOK-CD38-WT or JOK-CD38-KO to adhere to HMEC-1 was assessed as previously described.¹³ Briefly, monolayers of HMEC-1 were produced in 96 multiwell tissue culture plates and either activated with 100 ng/ml of LPS or left untreated. JOK-CD38-WT or JOK-CD38-KO cultures were incubated with 5 μ M BCECF-AM (Life Technologies, Corp.), washed, then 10^5 of these labeled cells set onto the monolayers. Adhesion was allowed for 1 hour at 37°C, then monolayers were washed and fluorescence intensity measured at 535 nm using a SpectraMax® i3 Multi-Mode Detection Platform (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA). All values were corrected by subtraction of the fluorescence intensity of monolayers incubated with wash buffer alone. These corrected values were then plotted against standard curves of fluorescence intensity constructed from serial dilutions of a known number of the corresponding HCL cell line labeled with BCECF-AM.

Mouse husbandry

Mice utilized for subcutaneous xenografts of HCL were housed in sterilized GM500 ventilated cages on a Green Line® rack (Techniplast France S.A., Lyon). This housing system was kept in a barrier room accredited by the Direction Départementale de la Protection des Populations du Nord. Mice were monitored daily and sterile water and Rat & Souris N°1

Entretien® diet (SDS Special Diet Services France, Argenteuil) was provided *ad libitum*. Mice utilized for intraperitoneal xenografts of HCL were housed in sterilized Super Mouse 750™ Micro-Isolator™ ventilated cages on a RAIR Isosystem™ rack (Lab Products, Inc., Seaford, DE). This housing system was kept in a barrier room accredited by AAALAC-I. Mice were monitored daily and sterile water and Teklad Global 18% Protein Rodent Diet™ (Harlan Laboratories, Inc) was provided *ad libitum*.

Xenograft mouse models

The role of CD38 in HCL was assessed using 5×10^6 of the cell line pools JOK-CD38-WT or JOK-CD38-KO injected subcutaneously into male or female mice that were 6 - 8 weeks old and of the strain NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2r^{tm1Wjl}/SzJ (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Four weeks after injection, mice were sacrificed and tumors dissected, weighed and measured with an electronic caliper. Tumor volumes were calculated according to the formula: $(4 \times \pi \times L \times W \times T) / 3$, where L is length, W is width and T is thickness. The therapeutic efficacy of targeting CD38 was assessed using 4×10^6 of the cell line pool JOK-Luc injected into the peritoneum of female mice that were 3 - 4 weeks old and of the strain Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} (Harlan Laboratories, Inc., Indianapolis, IN). After 3 days mice were anesthetized and injected intravenously with 150 µl of Dulbecco's phosphate buffered saline containing 15 mg/ml D-Luciferin potassium salt (Regis Technologies, Inc., Morton Grove, IL). Superimposed luminescence and X-ray images were acquired using a MS FX PRO In Vivo Imaging System (Bruker Corp., Billerica, MA). The day after imaging, mice with visible tumors were injected intraperitoneally with 120 µl of phosphate buffered saline containing 1 mg/ml of either the humanized anti-CD38 antibody SAR650984 (Sanofi Oncology, Cambridge, MA) or a non-immune IgG1 kappa antibody purified from human myeloma plasma (Sigma-Aldrich, Corp.). Two days later the antibody injections were repeated and the following day mice were again imaged. Intraperitoneal xenograft protocols

were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Wisconsin, La Crosse, Wisconsin, USA. Subcutaneous xenograft protocols were approved by the Animal Care Ethical Committee, Nord-Pas-de-Calais, France.

Results

CD38 expression in HCL is dependent upon low-level RhoH

In previous studies we determined that HCL is characterized by under-expression of the intracellular signaling molecule RhoH (9). This low-level expression likely contributes to the pathogenesis of the disease by unleashing Ras signaling that ultimately results in aberrant transcription of the CD11c gene and consequent extravasation of the neoplastic lymphocytes (7, 9). Reconstitution of RhoH expression ameliorated HCL pathogenesis in a xenograft mouse model (9). However, transition of this therapeutic approach to the clinic is not likely to be immanent as targeting the reconstitution of an intracellular protein is immensely challenging. Therefore, we sought a readily *druggable* surface protein that was dependent upon RhoH under-expression. This was achieved using the cell lines JOK-Empty and JOK-RhoH (9). These lines are derived from the HCL cell-line JOK-1 and stably express either the parental vector pMEP4 or this same vector encoding RhoH. Comparison of the transcriptomes of these two derivatives by differential microarray analysis demonstrated that the mRNA encoding the surface protein CD38 was expressed in JOK-RhoH at 0.145 the level it was expressed in JOK-Empty ($p = 0.003$). Repression of CD38 mRNA expression by RhoH reconstitution was confirmed by RT-PCR analysis (Figure 1a). Repression of CD38 protein expression was demonstrated by western blotting (Figure 1b). Finally, flow cytometry demonstrated that RhoH reconstitution repressed the surface expression of CD38 (Figure 1c).

CD38 is differentially expressed both by HCL cell lines and HCL patients

The expression of CD38 in HCL beyond JOK-1 was assessed initially by examining a range of different cell lines by western blotting (Figure 2a). Such analysis demonstrated that while the HCL cell lines JOK-1, HC-1, Hair-M and Eskol are CD38-positive, the HCL line EH/K is negative. This finding of differential expression of CD38 in HCL was confirmed by analysis of HCL patients. Two of eight HCL patients diagnosed at Gundersen Health Center in the USA exhibited CD38 expression in bone marrow biopsies (Figure 2b). In addition, examination of the clinical records of 43 HCL patients diagnosed at the Centre Hospitalier Universitaire de Caen in France revealed 16 were CD38-positive in the bone marrow and/or peripheral blood. Taken together, the results from the USA and France indicate that the neoplastic lymphocytes of approximately one third of HCL patients exhibit CD38 expression. This proportion is consistent with what has been reported for HCL patients in Sweden (15).

CD38 expression is a marker of poor HCL prognosis

The impact of CD38 expression on clinical course was evaluated by retrospective analysis of the clinical records of the 43 patients diagnosed with classical HCL at the Centre Hospitalier Universitaire de Caen. Specifically, we investigated the time between the end of first-line therapy and the beginning of salvage therapy at first relapse. This interval was designated as the time to next treatment (TTNT). In the 43 cases it was found that for the 27 patients who were CD38-negative TTNT was 83 months but for the 16 patients who were CD38-positive TTNT was only 42 months (Figure 3a). When we analyzed specifically the 23 of the 43 patients that relapsed, the difference in TTNT between CD38-negative and CD38-positive cases was even more dramatic. Here TTNT of the 15 patients who were CD38-negative was 95 months but only 24 months for the 8 patients who were CD38-positive (Figure 3b).

CD38 expression promotes HCL growth by protecting against apoptosis

Clinical evidence indicates that CD38 expression in HCL correlates with poor prognosis. Next we sought to determine if CD38 expression represents a driver or a passenger in HCL pathogenesis. This was addressed by utilizing the HCL cell line JOK-1 that is CD38 positive (Figure 1b and Figure 2a). Zinc Finger Nuclease technology produced pools of this line that either contained homozygous frame-shift mutations within the CD38 coding region or contained no mutations within this same region (Supplementary information, Figure S2). These pools were designated JOK-CD38-KO and JOK-CD38-WT, respectively. Comparison of the two pools demonstrated that eight days after the initiation of cultures with equal numbers of cells the number of JOK-CD38-KO cells was 36% fewer than JOK-CD38-WT (Figure 4a). The rate at which cells grow in culture represents the sum of the balance between cell division and cell death. Therefore, which of these processes accounted for the difference in growth rate of JOK-CD38-KO and JOK-CD38-WT was investigated. Incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine demonstrated that in cultures of JOK-CD38-KO the percentage of cells in the DNA synthesis phase of the cell cycle was not significantly different than that in cultures of JOK-CD38-WT (Figure 4b). Consequently, CD38 expression appears not to influence HCL proliferation *in vitro*. However, in contrast, when apoptosis was assessed by cell-surface binding of annexin V and DNA accessibility to propidium iodide, the intrinsic apoptosis rate of JOK-CD38-KO after 72 hours of culture was found to be approximately one third higher than JOK-CD38-WT. (Figure 4c). Therefore, CD38 expression appears to enhance HCL growth not by effecting an increase in proliferation but rather by increasing cell survival.

CD38 expression promotes HCL adhesion

The adhesion of T cells and CLL B-lymphocytes to endothelial cells has previously been shown to be mediated by CD38 (16, 17). Therefore, we investigated the possibility that CD38 also contributes to the adhesive properties of HCL B-lymphocytes. Confluent monolayers of

human microvascular endothelial cells were prepared and either activated with LPS or left untreated. The ability of JOK-CD38-KO and JOK-CD38-WT to adhere to these monolayers was then assessed (Figure 5). This analysis demonstrated that JOK-CD38-KO was 34% less able to bind non-activated endothelial cells than JOK-CD38-WT and 39% less able to bind activated endothelial cells.

CD38 effects growth of HCL tumors in vivo

Analyses performed *in vitro* indicate that CD38 drives HCL survival and adhesion (Figure 4C and Figure 5). These results suggest CD38 expression may contribute to the pathogenesis of HCL *in vivo*. Therefore, to address this question JOK-CD38-WT and JOK-CD38-KO were injected subcutaneously into immunodeficient mice. After 4 weeks the resulting tumors were dissected, weighed and their dimensions measured. This analysis demonstrated that the tumors originating from JOK-CD38-KO had volumes that were on average 40% smaller than those originating from JOK-CD38-WT (Figure 6a). In addition, tumor weight was reduced on average by 43% (Figure 6b). Therefore, these results support the hypothesis that CD38 influences HCL pathogenesis *in vivo*.

Targeting CD38 regresses pre-existing HCL tumors in vivo

Experiments performed with JOK-CD38-KO indicate that targeting CD38 expression in HCL may have therapeutic efficacy. This was tested using the parent of JOK-CD38-KO where CD38 expression remained intact. The parental line was engineered such that it constitutively produced luciferase and, therefore, could be visualized by luminescence in the presence of luciferin. This line was then injected into the peritoneum of immunodeficient mice

and allowed to form tumors. These tumors were then treated with either a non-immune control antibody or the anti-CD38 antibody SAR650984 (18). Luminescence imaging demonstrated that tumors tended to continue to grow after treatment with the control antibody but tended to be reduced by treatment with SAR650984 (Figure 7).

Discussion

HCL is an indolent neoplasm predominantly of cells with a genetic signature related to memory B-lymphocytes (1, 19). A stubborn percentage of HCL cases are either resistant to available treatments or relapse with intractable disease (3, 4). HCL usually presents in late middle age. Therefore, in regions of the world such as North America and Western Europe with a baby-boom generation reaching retirement, the absolute number of HCL patients in need of novel treatments is set to increase. Here we report for the first time that targeting CD38 could represent one such novel therapy. We find that approximately one third of HCL patients exhibit CD38 expression and that this expression correlates with poor prognosis. Evidence developed *in vitro* indicates that the molecular basis of this heightened pathogenesis is the ability of CD38 to effect increased lymphocyte survival and an increased ability to bind endothelium.

The natural history of CD38 expression in HCL bares a striking resemblance to that in CLL. Both are indolent neoplasms with phenotypes related to memory B-cells (19-21). Approximately one-third of both HCL and CLL patients are CD38-positive when the cut-off for positivity is set at 30% of the malignant clone (22-24). In both HCL and CLL CD38 mediates adhesion to endothelial cells (16, 17). In both HCL and CLL CD38 protects against apoptosis (25, 26). In both HCL and CLL CD38-positivity is a negative prognostic indicator (22, 24, 27-31).

It is now widely accepted that in CLL there are dynamic shifts of neoplastic cells between the blood stream and lymphoid tissue. In the circulation CLL cells manifest resistance to apoptosis but are compromised in their ability to proliferate while in lymphoid tissue they are susceptible to apoptosis or induced to proliferate (32-35). These findings indicate that the

microenvironment of lymphoid tissue is necessary for CLL proliferation but not for apoptosis resistance (36). CD38 has been implicated in mediating both microenvironment-dependent CLL proliferation and microenvironment-independent survival (16, 37, 38). Extrapolating these roles of CD38 from CLL to HCL would provide an explanation for our observation that knockout of the CD38 gene fails to influence cell division in HCL mono-cultures but does compromise survival.

In addition to CLL, CD38 has previously been found to be expressed in a wide range of other hematologic malignancies including B-cell and T-cell acute lymphoblastic leukemia, multiple myeloma, B-cell non-Hodgkin's lymphoma and acute myeloid leukemia (39-42). Targeting CD38 in xenograft models of these malignancies has been demonstrated to have therapeutic efficacy and trials are currently underway to determine clinical utility (43-50). The results reported here indicate that HCL should be added to the list of blood cancers where anti-CD38 therapy is being evaluated. However, since monotherapy often results in the evolution of resistant disease, combining CD38 targeting with existing HCL treatments such as purine analogues and agents that target CD20 and B-Raf might prove particularly beneficial.

Acknowledgements

We would like to thank Jørn Koch, Edward Srouf, Guy Faguet and Laurent Plawinski for providing cell lines, Sanofi Oncology for the kind gift of SAR650984, Nathalie Jouy for help with flow cytometry analyses and Steven Cash for help with immunocytochemistry. We are indebted to IMPRT IFR114 for use of their Animalerie Haute-Technologie Plateforme de Ressources Expérimentales, their Beckman Coulter flow cytometer, Applied Biosystems Real-Time PCR System and their Becton Dickinson flow cytometer and cell sorter. We thank Amy Cooper for animal husbandry, Elisabeth Bertrand and Pauline Peyrouze for help with animal experiments and Brooklynn Scholze, Pat Fisher, Linda Wright and Julie Seiler for searches of pathology files. In addition, we would like to thank Martin Figeac, Frédéric Leprêtre, Sabine Quief and Céline Villenet for microarray analyses and Maud Collyn d'Hooghe for extended IRCL support of NP. Finally, we are indebted to the Mary Westlund Family Foundation for purchase of a Sakura Histo-Tek® SL auto-staining apparatus and to Betty Zane Kabara for purchase of a Bruker MS FX PRO In Vivo Imaging System and an Olympus BX43 microscope with image capture capability.

Supplementary Information

Supplementary information is available at the Cancer Research website.

References

1. Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood* 1958; **13**: 609-630.
2. Robak T. Current treatment options in hairy cell leukemia and hairy cell leukemia variant. *Cancer Treat Rev* 2006; **32**: 365-376.
3. Sári E, Nagy ZG, Baghy K, Rajnai H, Bödör C, Csomor J, *et al.* Treatment of refractory hairy cell leukemia with BRAF-inhibitor: lessons to be learnt. *Pathol Oncol Res* 2014; **20**: 973-980.
4. Else M, Dearden CE, Matutes E, Garcia-Talavera J, Rohatiner AZS, Johnson SAN, *et al.* Long-term follow-up of 233 patients with hairy cell leukaemia, treated initially with pentostatin or cladribine, at a median of 16 years from diagnosis. *Br J Haematol* 2009; **145**: 733-740.
5. Schwarting R, Stein H, Wang CY. The monoclonal antibodies α S-HCL (α Leu-14) and α S-HCL3 (α Leu-M5) allow the diagnosis of hairy cell leukemia. *Blood* 1985; **65**: 974-983.
6. Shelley CS, Böttinger EP, Arnaout MA. Transcriptional regulation of β 2 integrins. In: *Leukocyte adhesion: Basic and Clinical Aspects* (Elsevier Science Publishers B.V.) 1992; pp. 337-351.
7. Nicolaou F, Teodoridis JM, Park H, Georgakis A, Farokhzad OC., Böttinger EP, *et al.* *CD11c* gene expression in hairy-cell leukemia is dependent upon activation of the proto-oncogenes *ras* and *junD*. *Blood* 2003; **101**: 4033-4041.
8. Li X, Bu X, Lu B, Avraham H, Flavell RA, Lim B. The hematopoietic-specific GTP-binding protein RhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function. *Mol Cell Biol* 2002; **22**:1158-1171.
9. Galiègue-Zouitina S, Delestré L, Dupont C, Troussard X, Shelley CS. Underexpression of RhoH in hairy cell leukemia. *Cancer Res* 2008; **68**: 4531-4540.
10. Fu Q, Cash SE, Andersen JJ, Kennedy CR, Oldenburg DG, Zander VB, *et al.* CD43 in the nucleus and cytoplasm of lung cancer is a potential therapeutic target. *Int J Cancer* 2013; **132**: 1761-1770.

11. Fu Q, Cash SE, Andersen JJ, Kennedy CR, Madadi AR, Raghavendra M, *et al.* Intracellular patterns of sialophorin expression define a new molecular classification of breast cancer and represent new targets for therapy. *Br J Cancer* 2014; **110**: 146-155.
12. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houliham A, Meeus P, Catovsky D. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 1994; **14 Suppl 1**: 57-61.
13. Drexler HG, Dirks WG, Matsuo Y, MacLeod RAF. False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia* 2003; **17**: 416-426.
14. Delestré L, Berthon C, Quesnel Bb, Figeac M, Kerckaert J-P, Galiègue-Zouitina S, *et al.* Repression of the *RHOH* gene by JunD. *Biochem J* 2011; **437**: 75-88.
15. Juliusson G, Lenkei R, Liliemark J. Flow cytometry of blood and bone marrow cells from patients with hairy cell leukemia: phenotype of hairy cells and lymphocyte subsets after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood* 1994; **83**: 3672-3681.
16. Deaglio S, Mallone R, Baj G, Arnulfo A, Surico N, Dianzani U, *et al.* CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. *Chem Immunol* 2000; **75**: 99-120.
17. Patten PE, Buggins AG, Richards J, Wotherspoon A, Salisbury J, Mufti GJ, *et al.* CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* 2008; **111**: 5173-5181.
18. Deckert J, Wetzel MC, Bartle LM, Skaletskaya A, Goldmacher VS, Vallée, F, *et al.* SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2014; **20**: 4574-4583.
19. Basso K, Liso A, Tiacci E, Benedetti R, Pulsoni A, Foa R, *et al.* Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors. *J Exp Med* 2004; **199**: 59-68.
20. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, *et al.* Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; **194**: 1625-1638.
21. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; **194**: 1639-1648.

22. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1840-1847.
23. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Ferrero E, Malavasi F. In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; **108**: 1135-1144.
24. Matrai Z. CD38 as a prognostic marker in CLL. *Hematology* 2005; **10**: 39-46.
25. Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, Bonello L, Horenstein AL, Tamagnone L, *et al.* CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005; **105**: 3042-3050.
26. Pepper C, Ward R, Lin TT, Brennan P, Starczynski J, Musson M, *et al.* Highly purified CD38⁺ and CD38⁻ sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin. *Leukemia* 2007; **21**: 687-696.
27. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, *et al.* Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**: 2633-2639.
28. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, *et al.* CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**: 181-186.
29. Jelinek DF, Tschumper RC, Geyer SM, Bone ND, Dewald GW, Hanson CA, *et al.* Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; **115**: 854-861.
30. Morabito F, Mangiola M, Oliva B, Stelitano C, Callea V, Deaglio S, *et al.* Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2001; **25**: 927-932.
31. Dürig J, Naschar M, Schmücker U, Renzing-Köhler K, Hölter T, Hüttmann A, *et al.* CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2002; **16**: 30-35.
32. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009; **114**: 3367-3375.

33. Calissano C, Damle RN, Hayes G, Murphy EJ, Hellerstein MK, Moreno C, *et al.* In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; **114**: 4832-4842.
34. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 37-50.
35. Damle RN, Calissano C, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukaemia: a disease of activated monoclonal B cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; **23**: 33-45.
36. Deaglio S, Malavasi F. Chronic lymphocytic leukemia microenvironment: shifting the balance from apoptosis to proliferation. *Haematologica* 2009; **94**: 752-756.
37. Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M, Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood* 2011; **118**: 3470-3478.
38. Deaglio S, Vaisitti T, Zucchetto A, Gattei V, Malavasi F. CD38 as a molecular compass guiding topographical decisions of chronic lymphocytic leukemia cells. *Sem Cancer Biol* 2010; **20**: 416-423.
39. Keyhani A, Huh YO, Jendiroba D, Pagliaro L, Cortez J, Pierce S, *et al.* Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia. *Leuk Res* 2000; **24**: 153-159.
40. Konopleva M, Rissling I, Andreeff M. CD38 in hematopoietic malignancies. *Chem Immunol* 2000; **75**: 189-206.
41. Leo R, Boeker M, Peest D, Hein R, Bartl R, Gessner JE, *et al.* Multiparameter analyses of normal and malignant human plasma cells: CD38++, CD56+, CD54+, clg+ is the common phenotype of myeloma cells. *Ann Hematol* 1992; **64**: 132-139.
42. Schuurman H-J, Huppes W, Verdonck LF, van Baarlen J, van Unnik JAM. Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphoma. Correlation with relapse-free survival. *Am J Pathol* 1988; **131**: 102-111.
43. Stevenson FK, Bell AJ, Cusack R, Hamblin TJ, Slade CJ, Spellerberg MB, *et al.* Preliminary studies for an immunotherapeutic approach to the treatment of human myeloma using chimeric anti-CD38 antibody. *Blood* 1991; **77**: 1071-1079.
44. Goldmacher VS, Bourret LA, Levine BA, Rasmussen RA, Pourshadi M, Lambert JM, *et al.* Anti-CD38-blocked ricin: an immunotoxin for the treatment of multiple myeloma. *Blood* 1994; **84**: 3017-3025.

45. de Weers M, Tai YT, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DC, *et al.* Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol* 2011; **186**: 1840-1848.

46. Chillemi A, Zaccarello G, Quarona V, Ferracin M, Ghimenti C, Massaia M, *et al.* Anti-CD38 antibody therapy: windows of opportunity yielded by the functional characteristics of the target molecule. *Mol Med* 2013; **19**: 99-108.

47. Ellis JH, Barber KA, Tutt A, Hale C, Lewis AP, Glennie MJ, *et al.* Engineered anti-CD38 monoclonal antibodies for immunotherapy of multiple myeloma. *J Immunol* 1995; **155**: 925-937.

48. Mehta K, Ocanas L, Malavasi F, Marks JW, Rosenblum MG. retinoic acid-induced CD38 antigen as a target for immunotoxin-mediated killing of leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2004; **3**: 345-352.

49. Flavell DJ, Boehm DA, Emery L, Noss A, Ramsay A, Flavell SU. Therapy of human B-cell lymphoma bearing SCID mice is more effective with anti-CD19- and anti-CD38-saporin immunotoxins used in combination than with either immunotoxin used alone. *Int J Cancer* 1995; **62**: 337-344.

50. Mihara K, Yanagihara K, Takigahira M, Kitanaka A, Imai C, Bhattacharyya J, *et al.* Synergistic persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2010; **151**: 37-46.

Figure Legends

Figure 1 Induction of RhoH in HCL down-regulates CD38 expression. **(a)** Quantitative RT-PCR analysis showing that when RhoH expression is induced in JOK-1 HCL cells (JOK-RhoH) CD38 mRNA levels are significantly reduced compared to JOK-1 HCL cells where RhoH expression is not induced (JOK-Empty) (Paired Student *t*-test: $P = 0.0026$). Histograms represent the mean of four experiments performed in duplicate \pm s.d. **(b)** Western blot analysis using an anti-CD38 mouse monoclonal antibody showing that when RhoH expression is induced in JOK-1 HCL cells (JOK-RhoH) CD38 protein levels in total protein lysates are lower than in JOK-1 where RhoH is not induced (JOK-Empty). An antibody against β -actin was used in the control analysis of lysates. **(c)** Flow cytometric analysis showing that expression of CD38 on the surface of JOK-1 cells is lower when RhoH is induced (JOK-RhoH) compared to when RhoH is not induced (JOK-Empty). Analysis was performed using a FITC-conjugated antibody that specifically binds CD38 (CD38 Ab) or an isotype-matched control antibody (Isotype Ab). A representative example of the flow patterns acquired is depicted along with the mean percentages of FITC-positive cells calculated from 4 experiments \pm s.d. After subtraction of the fluorescence intensity attributable to the control antibody, the mean fluorescence intensity attributable specifically to the CD38 antibody was 71.8 ± 14.3 s.d. for JOK-Empty and significantly less at 19.7 ± 9.0 s.d. for JOK-RhoH (Paired Student *t*-test: $P = 0.0006$).

Figure 2 CD38 is differentially expressed by HCL cell lines and patients. **(a)** Western blot analysis of total protein lysates showing that CD38 is expressed by the HCL cell lines JOK-1, HC-1, Hair-M and Eskol but not the HCL cell line EH/K. An antibody against GAPDH was used in the control analysis of lysates. **(b)** Immunohistochemical analysis of CD38 expression in bone marrow biopsies taken from HCL and CLL patients. Eight HCL patients

were examined in this way and two found to be CD38-positive. The analysis of one of these CD38-positive patients is depicted (Panel A). The analysis of one of the six HCL patients determined to be CD38-negative is depicted (Panel B). As a control for the analysis of HCL patients, bone marrow biopsies taken from two CLL patients were identically examined for CD38 expression. The diagnostic pathology record of one of these CLL patients indicated that the bone marrow was CD38-positive (Panel C). The pathology record of the second CLL patient indicated the bone marrow was CD38-negative (Panel D). All images were taken at a magnification of x 100.

Figure 3 CD38 is a marker of poor prognosis. **(a)** Kaplan-Meier plot showing the time between the end of first line therapy and the beginning of salvage therapy in 43 cases of HCL. This time interval was designated as the time to next treatment (TTNT). The 16 cases that were CD38-positive and the 27 cases that were CD38-negative are plotted separately with dotted and solid lines, respectively. The mean TTNT of the CD38-positive patients was significantly shorter than that of the patients who were CD38-negative (Gehan-Breslow-Wilcoxon test: $P = 0.0023$). **(b)** Kaplan-Meier plot showing the TTNT only of the 23 patients within the total of 43 analyzed that suffered relapse. CD38-positive and CD38-negative cases are plotted separately with dotted and solid lines, respectively. The mean TTNT of 8 CD38-positive patients was significantly shorter than that of 15 patients who were CD38-negative (Gehan-Breslow-Wilcoxon test: $P < 0.0001$). Within the CD38-positive group, 4 had first-line therapy with interferon and 4 had first-line therapy with purine analogs. Within the CD38-negative group, 6 were initially treated with interferon and 9 with purine analogs.

Figure 4 CD38 promotes HCL growth. **(a)** At day 0 cultures of JOK-CD38-KO and JOK-CD38-WT were initiated at a density of 5×10^5 cells per ml. Thereafter, cells were counted at day 2, 4, 6 and 8. At each time point the number of JOK-CD38-WT cells (CD38-WT) was

assigned a value of 100 and the number of JOK-CD38-KO cells (CD38-KO) calculated as a percentage of this value. Histograms represent the mean \pm s.d. of 3 experiments. At day 4, 6 and 8 the number of JOK-CD38-KO cells was significantly fewer than the number of JOK-CD38-WT cells (Paired Student *t*-test: $P = 0.0257$, 0.0342 and 0.0036 , respectively). **(b)** The rate of cell division was assessed by measuring the percentage of cells in culture that incorporated EdU and thus designated to be in the S phase of the cell cycle. Histograms represent the mean \pm s.d. of 3 experiments. There is no significant difference between cultures of JOK-CD38-WT (CD38-WT) and JOK-CD38-KO (CD38-KO) (Paired Student *t*-test: $P = 0.1571$). **(c)** The rate of cell death was assessed by determining the percentage of cells in 72 hour cultures that expressed annexin V and also stained with propidium iodide. These cells were designated to be undergoing apoptosis. Histograms represent the mean \pm s.d. of 4 experiments. The percentage of cells undergoing apoptosis was significantly higher in cultures of JOK-CD38-KO (CD38-KO) than in cultures of JOK-CD38-WT (CD38-WT) (Paired Student *t*-test: $P = 0.0091$).

Figure 5 CD38 promotes HCL adhesion. Confluent monolayers of human microvascular cells (HMEC-1) were prepared and either left not activated or activated with LPS. These monolayers were then incubated with JOK-CD38-WT (CD38-WT) or JOK-CD38-KO (CD38-KO) that had previously been labeled with the fluorescent marker BCECF-AM. After 1 hour non-adherent cells were washed off and the fluorescence intensity of monolayers measured. The fluorescence of monolayers that had not been incubated with cells was subtracted from this value to give a measure of the fluorescence acquired by monolayers specifically from the adherence of HCL cells. These specific fluorescence measures were then plotted on standard curves constructed from serial dilutions of a known number of the corresponding HCL cell line labeled with BCECF-AM. In this way the number of adherent cells was calculated. Histograms represent the mean \pm s.d. of 4 experiments performed at minimum in triplicate. The adherence of JOK-CD38-KO to both not activated and activated endothelial

cells was significantly lower than the adherence of JOK-CD38-WT (Paired Student *t*-test: *P* = 0.0332 and 0.0126 respectively).

Figure 6 CD38 promotes HCL growth *in vivo*. (a) Eight mice of the strain NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rγ^{tm1Wjl}/SzJ were injected subcutaneously with 5 x 10⁶ JOK-CD38-WT (CD38-WT) and seven mice of the same strain were identically injected with JOK-CD38-KO (CD38-KO). After 4 weeks the resulting subcutaneous tumors were dissected and their volumes calculated from dimension measurements. The tumor volume in each mouse is presented as a filled square. Horizontal dotted lines show the mean tumor volumes produced by JOK-CD38-WT and JOK-CD38-KO. Vertical bars delineate the s.d. of these volumes. The mean volume of tumors produced by JOK-CD38-KO was significantly smaller than that of those produced by JOK-CD38-WT (Unpaired Student *t*-test: *P* = 0.0525). (b) The weight of the same tumors where volume was calculated. The mean weight of tumors produced by JOK-CD38-KO was significantly less than that of those produced by JOK-CD38-WT (Unpaired Student *t*-test: *P* = 0.0273).

Figure 7 Targeting CD38 treats pre-existing HCL *in vivo*. JOK-1 cells were stably transfected with the plasmid pGL4.5[Luc2/CMV/Neo] that contains the firefly luciferase gene under control of the constitutive gene promoter of cytomegalovirus. This luciferase cell line was then injected into the peritoneum of mice of the strain Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}. After 3 days mice were subjected to whole body imaging following intravenous injection of D-Luciferin. Those mice where tumor was detected were intraperitoneally injected at day 4 and day 6 with the anti-CD38 antibody SAR650984 or an IgG control antibody. At day 7 mice were again imaged. Depicted are superimposed luminescence and X-ray images of three mice injected with SAR650984 (CD38) and three injected with the control antibody (Ctrl).

Fig 1

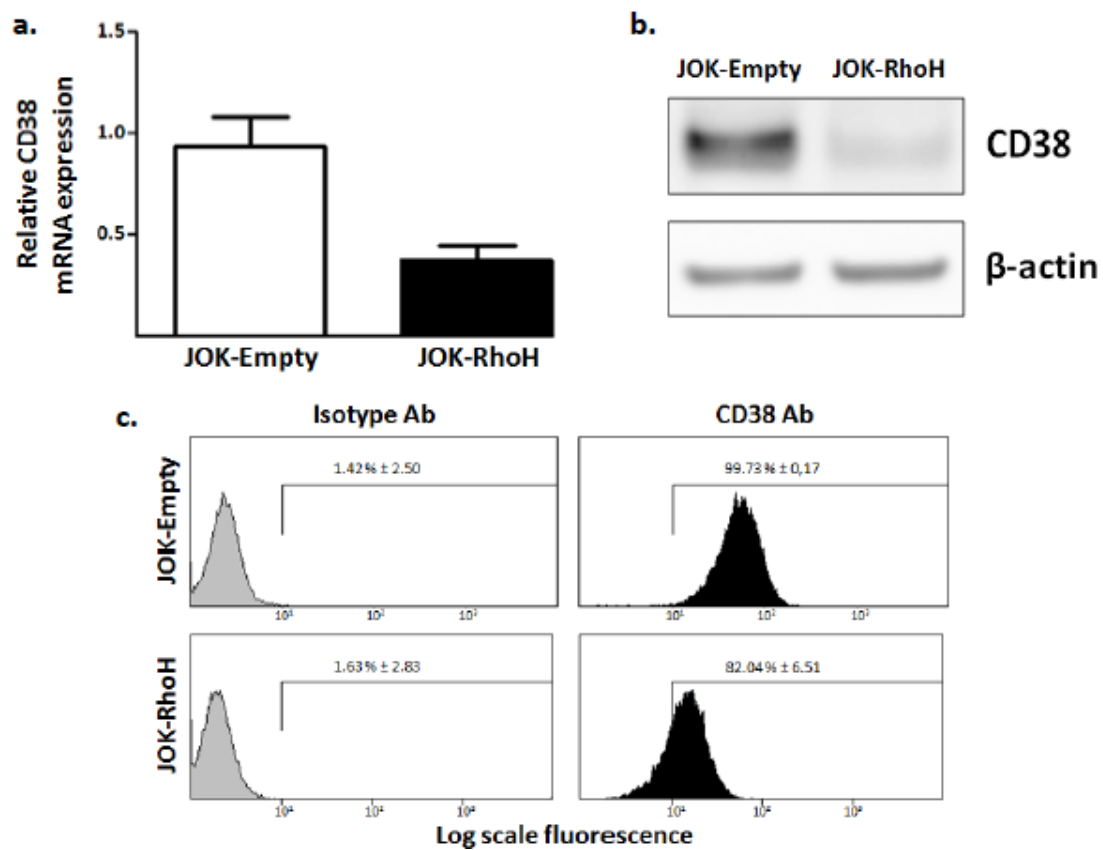


Fig 2

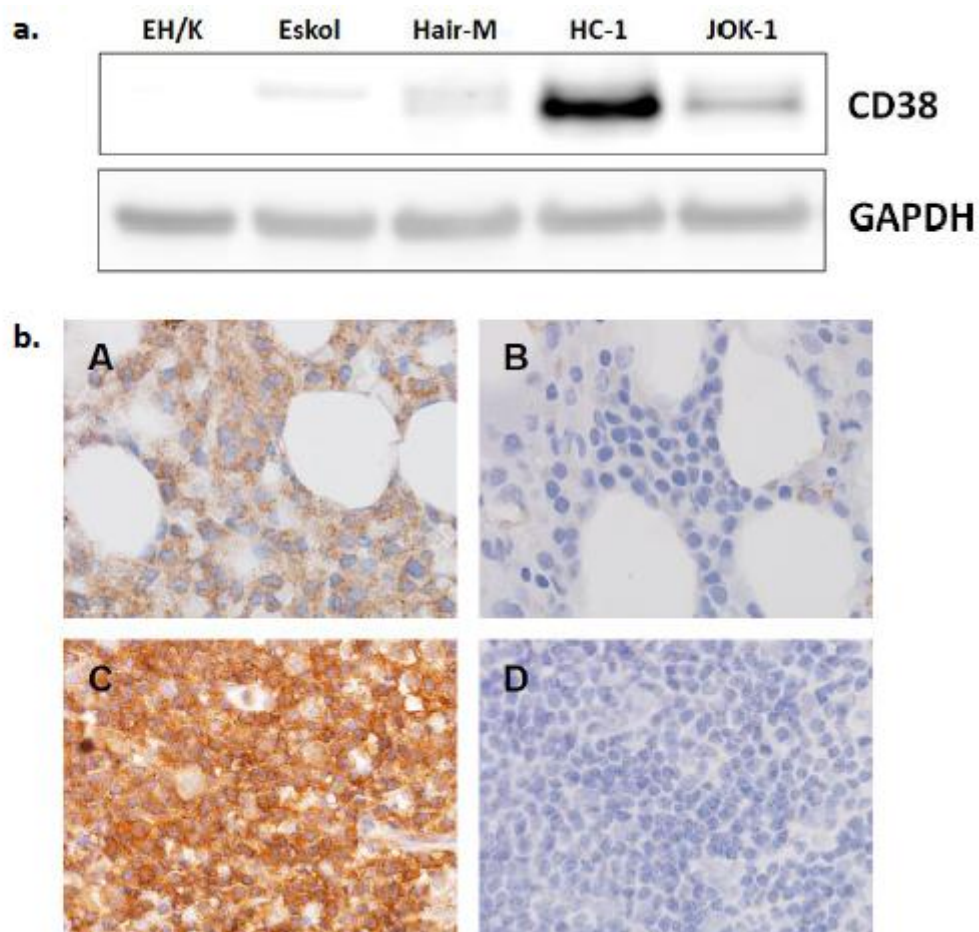


Fig 3

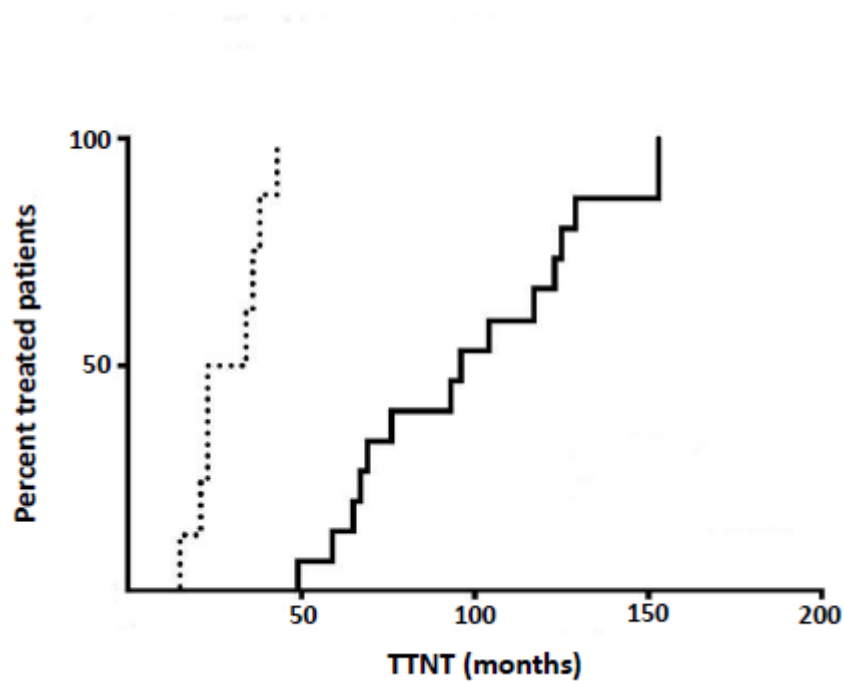


Fig 4

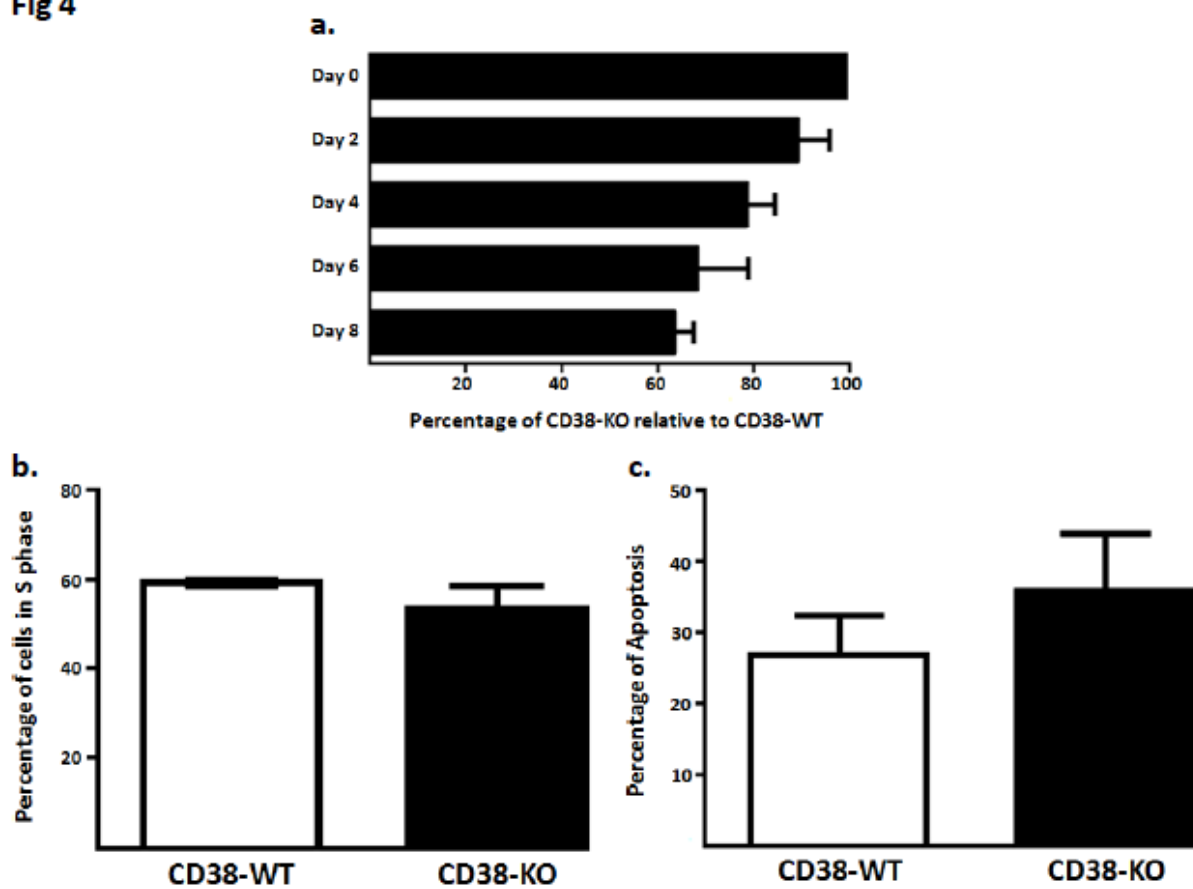


Fig 5

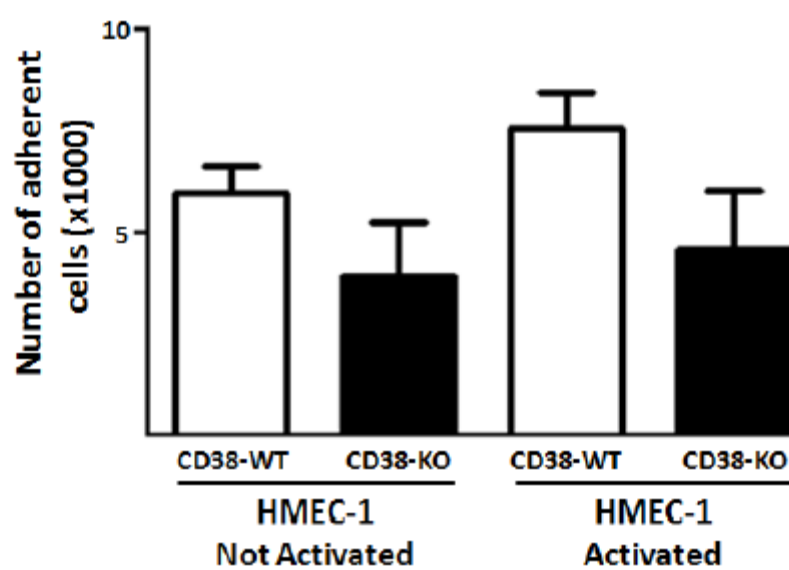


Fig 6

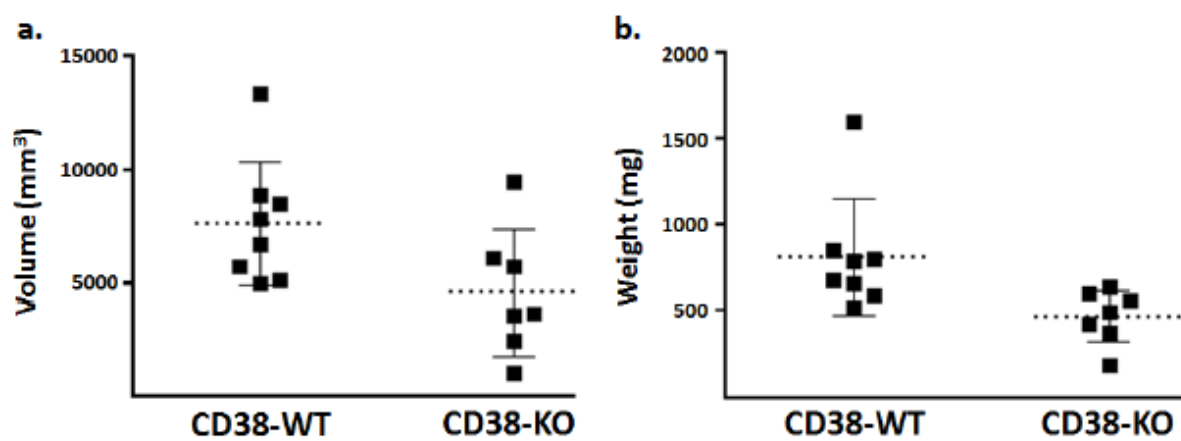


Fig 7

